

Optimierung der Kultivierung humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen und deren Expansion in einem miniaturisierten Bioreaktorsystem

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Carsten Griesel
aus Lüneburg

1. Referent:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

apl. Prof. Dr. Roland Wagner

apl. Prof. Dr. Siegmund Lang

05.11.2007

18.02.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Ding, H., Griesel, C., Nimtz, M., Conradt, H.S., Weich, H.A., Jäger, V.
Molecular cloning, expression, purification, and characterization of soluble full-length, human interleukin-3 with a baculovirus-insect cell expression system. Protein Expr. Purif. 2003; 31(1): 34-41.

Tagungsbeiträge

Nicht zutreffend

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Das hämatopoetische System.....</i>	1
1.1.1	Aufbau des hämatopoetischen Systems	2
1.1.2	Charakterisierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen	3
1.1.2.1	Phänotypisierung von hämatopoetischen Stammzellen.....	4
1.1.2.2	Funktionelle Charakterisierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen	6
1.2	<i>Transplantation hämatopoetischer Stammzellen</i>	9
1.3	<i>Gewinnung und Isolation von hämatopoetischen Stammzellen</i>	10
1.3.1	Quellen von Stammzellen.....	10
1.3.1.1	Knochenmark	10
1.3.1.2	Stammzellapherese.....	11
1.3.1.3	Nabelschnurblut	12
1.4	<i>Kultivierung hämatopoetischer Zellen</i>	13
1.4.1	Kultivierungstechniken und Kulturparameter	15
1.4.2	Physikochemische Kulturparameter	16
1.4.2.1	Der Gelöstsauerstoff-Partialdruck	16
1.4.2.2	Der pH-Wert	17
1.4.2.3	Die Osmolarität.....	17
1.4.2.4	Die Temperatur	18
1.4.3	Kulturmedien	18
1.4.4	Wachstumsfaktoren vs. Kokultivierungsstrategien	20
1.4.4.1	Hämatopoetische Wachstumsfaktoren.....	20
1.4.4.2	Herstellung und Einsatz humaner Wachstumsfaktoren	23
1.4.4.3	Der Einsatz stromazellkonditionierter Medien	24
1.4.4.4	Zelluläre Systeme zur Kokultivierung	25
1.4.5	Kulturführungsstrategien	27
1.4.5.1	Kultursysteme für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen	27
1.4.6	Einsatz von Bioreaktoren.....	32
1.4.6.1	Primäranforderungen an Bioreaktoren	32
1.4.6.2	Ziele des Einsatzes von Bioreaktoren	33
1.4.6.3	Biokompatibilität von Zellkulturmaterialien	34
1.5	<i>Zielsetzung und Aufbau der Arbeit</i>	35
1.5.1	Zielsetzung und Aufgabenstellung	35
1.5.2	Struktur der vorliegenden Arbeit.....	37
2	Material und Methoden	39
2.1	<i>Zelllinien und Viren.....</i>	39
2.1.1	KG-1a	39
2.1.2	HL-60.....	39
2.1.3	M2-10B4	40
2.1.4	SAOS-2	40
2.1.5	C3H10T1/2	40
2.1.6	5637.....	41
2.1.7	M-07e	41
2.1.8	Sf9	41
2.1.9	BTI Tn5B1-4 (High Five®).....	42
2.1.10	Rekombinante Baculoviren.....	42
2.2	<i>Quellen und Gewinnung von Primärzellen</i>	42
2.2.1	CD34 ⁺ -Zellen	42

2.2.2	Aufreinigung CD34-positiver Zellen	43
2.2.3	Isolierung primärer Stromazellen aus humanem Knochenmark	45
2.2.4	Isolierung primärer HUVEC	45
2.3	<i>Medien und Supplemente</i>	47
2.3.1	Fötales Kälberserum	47
2.3.2	Humanes AB-Serum	47
2.3.3	Basalmedien für die Kultur primärer Blutzellen	48
2.3.4	T-Ex-Cell 401 (TEX/Asn)	49
2.3.5	HUVEC Wachstumsmedium	49
2.3.6	ZKT-1-Medium	50
2.3.7	Humane Wachstumsfaktoren	50
2.3.8	Herstellung von 5637-konditioniertem Medium	50
2.3.9	Konditionierung von Zellkulturüberständen	51
2.3.9.1	Konzentrierung der konditionierten Zellkulturüberstände	51
2.4	<i>Kultivierung und Vorbereitung</i>	52
2.4.1	Auftauen von Zellen	52
2.4.2	Kryokonservierung von Säugetierzellen	53
2.4.3	Subkultivierung adhärenter Zellen	53
2.4.4	Entfernung von Erythrozyten	53
2.5	<i>Prozessanalytik</i>	54
2.5.1	Bestimmung der Zellzahl	54
2.5.2	Bestimmung der Zellgrößenverteilung mittels CASY	54
2.5.3	Zellkernzählung	55
2.5.4	Quantitative Bestimmung von Glukose und Laktat	55
2.5.5	Quantitative Bestimmung freier Aminosäuren	55
2.5.6	Quantitative Bestimmung der freien Laktatdehydrogenase-Aktivität	56
2.5.7	Messung der Osmolarität	57
2.6	<i>Berechnete Größen</i>	57
2.6.1	Spezifische Wachstumsrate	57
2.6.2	Berechnung der Zellzahl CD34-positiver Zellen	57
2.6.3	Berechnung der Zellzahl Kolonie-bildender Zellen	57
2.6.4	Berechnung der Zahlen der Cobblestone-Area Forming Cells	58
2.6.5	Zellspezifische Bildungs- und Verbrauchsdaten	58
2.6.6	Arithmetischer Mittelwert	58
2.6.7	Standardabweichung	59
2.6.8	Variationskoeffizient	59
2.6.9	Fehlerfortpflanzung	59
2.6.10	Relative spezifische Wachstumsfaktoraktivität	60
2.7	<i>Durchflusszytometrie</i>	61
2.7.1	Durchflusszytometrische Analyse CD34-positiver Zellen	61
2.7.2	Durchflusszytometrische Analyse apoptotischer Zellen	62
2.8	<i>Kurzzeit-Kulturassays (CFU-Assays)</i>	63
2.8.1	CFU-Meg (CFU-Meg-Assay)	65
2.8.2	Cobblestone-Area Forming Cell-Assay (CAFC-Assay)	66
2.9	<i>Produktion und Aufreinigung von Wachstumsfaktoren</i>	68
2.9.1	Insektenzellkultur und Stammhaltung	68
2.9.2	Produktion rekombinanter Wachstumsfaktoren im Bioreaktor	68
2.9.3	Isolierung von His ₍₆₎ -Tag-Fusionsproteinen	69

2.10	<i>Proteinanalytik und –Charakterisierung</i>	70
2.10.1	Proteinbestimmung	70
2.10.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	70
2.10.3	Silberfärbung der Gele	71
2.10.4	Western-Blotting	71
2.10.5	Immunchemischer Nachweis der Proteine auf der PVDF-Membran	72
2.10.6	Proteinsequenzierung	73
2.10.7	Quantitative Bestimmung der Wachstumsfaktoraktivität	73
2.10.7.1	³ H-Thymidineinbau-Test	73
2.10.7.2	WST-1-Test	74
2.11	<i>Aufbau des Bioreaktorsystems</i>	74
2.11.1	Blasenfreie Begasung im Meredos Bioreaktorsystem	77
2.11.2	Kontinuierliche Medienperfusion mit Zellrückhaltung	77
2.12	<i>Charakterisierung des Bioreaktorsystems</i>	77
2.12.1	Bestimmung der Mischzeitkonstante	77
2.12.2	Bestimmung des Sauerstoffübergangskoeffizienten $k_L a$	78
2.12.3	Relative Sedimentationsgeschwindigkeit von Zellen	81
2.12.4	Berechnung der Sauerstoffaufnahme	82
3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	83
3.1	<i>Isolierung CD34-positiver Zellen aus Apheresaten</i>	83
3.2	<i>Identifizierung des Basalmediums</i>	85
3.2.1	Einfluss des Basalmediums auf die Kultivierung	85
3.2.2	Einfluss des Basalmediums auf Gesamtzellexpansion und Vitalität	86
3.2.2.1	Korrelation zwischen Trypanblau- und Annexin-V-Färbung	90
3.2.3	Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate	91
3.2.4	Verbrauch einzelner Aminosäuren	94
3.2.5	Differenzierung von Vorläuferzellen	97
3.3	<i>Gezielte Supplementierung mit L-Serin und L-Asparaginsäure</i>	101
3.4	<i>Wachstumsfaktoren für die Proliferation von CD34⁺-Zellen</i>	105
3.5	<i>Produktion rekombinanter Wachstumsfaktoren</i>	107
3.5.1	Produktion und Reinigung von humanem SCF und Interleukin-3	107
3.5.2	Produktion im Bioreaktormaßstab	108
3.5.3	Aufreinigung der Wachstumsfaktoren	109
3.5.4	Qualitätskontrolle der aufgereinigten Wachstumsfaktoren	110
3.5.4.1	SDS-PAGE- und Western-Blotting-Analyse des humanen IL-3	110
3.5.4.2	SDS-PAGE- und Western-Blotting-Analyse des humanen SCF	111
3.5.4.3	Sequenzierung des gereinigten Interleukin-3 und SCF	112
3.5.5	Ausbeuten der Aufreinigungen des SCF und IL-3	113
3.5.6	Bestimmung der relativen spezifischen biologischen Aktivität	114
3.5.6.1	Biologische Aktivität des rekombinanten Interleukin-3	114
3.5.6.2	Biologische Aktivität des rekombinanten SCF	116
3.5.6.3	Korrektur der biologischen Aktivität des hergestellten Interleukin-3	117
3.5.7	Einsatz Insektenzell-sekretierter Wachstumsfaktoren	119
3.6	<i>Permanente Stimulation mit Wachstumsfaktoren</i>	121
3.7	<i>Einsatz von Animal Derived Factors als Serumersatz</i>	124
3.8	<i>Konditionierte Zellkulturüberstände</i>	130
3.8.1	Etablierung der zellulären Konditionierungssysteme	131

3.8.2	Herstellung und Einsatz der Konzentrate	132
3.8.3	Konditionierten Zellkulturüberstände	133
3.8.3.1	Voruntersuchung der konditionierten Zellkulturüberstände	133
3.8.3.2	Kultur von CD34 ⁺ -Zellen mit konditionierten Zellkulturüberständen	134
3.9	<i>Einfluss allgemeiner Kulturparameter auf die Expansion</i>	139
3.9.1	Einfluss der Ausgangszellkonzentration	139
3.9.2	Einfluss der Kulturführungsstrategie	143
3.10	<i>Bioreaktorkultur hämatopoetischer Zelllinien und primärer Zellen</i>	148
3.10.1	Verfahrenstechnische Charakterisierung des Bioreaktorsystems	149
3.10.1.1	Mischzeitcharakteristik des Bioreaktorsystems	149
3.10.1.2	Sauerstoff-Übergangskoeffizient k_{La} des Bioreaktorsystems	150
3.10.2	Kultivierung im Bioreaktorsystem	152
3.10.2.1	Kultivierung der HL-60 Zelllinie	152
3.10.2.2	Ermittlung der optimalen Rührerdrehzahl	152
3.10.2.3	Experimentelle Überprüfung der theoretisch ermittelten OTR_{max}	153
3.10.2.4	Korrektur der Rührerdrehzahl für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen	156
3.10.2.5	Kultivierung der KG-1a und Ermittlung der optimalen Drehzahl	157
3.10.2.6	Stoffwechselaktivität im Bioreaktorsystem	158
3.10.2.7	Einfluss der Kulturdauer auf die Stoffwechselaktivität im Bioreaktor	160
3.10.3	Reduzierung der Scherbelastung durch Pluronic F-68	161
3.10.4	Perfusionskultur von humanen Zellen im Bioreaktor	165
4	Zusammenfassung und Ausblick	172
4.1	<i>Zusammenfassung</i>	172
4.2	<i>Ausblick</i>	173
5	Literaturverzeichnis	175
6	Abkürzungsverzeichnis	206

1 Einleitung

1.1 *Das hämatopoetische System*

Als Hämatopoese bezeichnet man die kontrollierte Produktion von reifen, funktionstüchtigen Blutzellen im Rahmen eines komplexen Schemas multilinearer Differenzierung, die bei adulten Vertebraten hauptsächlich im roten Knochenmark vorkommt. Das rote Knochenmark befindet sich in den Röhrenknochen, dem Beckenkamm, dem Sternum und dem Schädelknochen (von Keyserlingk, 1978). Eingebettet in das Mikromilieu des Knochenmarkstromas, einem Bindegewebe bestehend aus zellulären Bestandteilen, Extrazellulärmatrix-Proteinen sowie einer Vielzahl von stimulierenden und inhibierenden löslichen Faktoren - gebunden an Zellen oder der extrazellulären Matrix - sind die hämatopoetischen Zellen einer Vielzahl von Interaktionen ausgesetzt (McAdams et al., 1996a; Nardi und Alfonso, 1999). Die zellulären Anteile des Stromas werden überwiegend aus Fibroblasten, Endothelzellen, adventitiellen Retikulumzellen, Adipozyten und Makrophagen gebildet (Schwartz et al., 1992). Die proteinösen Bestandteile der extrazellulären Matrix bestehen aus Adhäsionsmolekülen und Proteoglykanen, wie z. B. Kollagen, Laminin oder Fibronektin (Klein, 1995; Whetton et al., 1998; Teixido et al., 1992; Rao et al., 1996). Die dritte Kategorie umfasst Proteine und Glykoproteine, die sowohl in löslicher als auch unlöslicher Form vorliegen können (Toksoz et al., 1992). Im Knochenmark werden diese Wachstumsfaktoren überwiegend von akzessorischen und hämatopoetischen Zellen selber gebildet (Linenberger et al., 1995; Lisovsky et al., 1996; Guerriero et al., 1997). Dabei können diese Faktoren Einfluss auf Differenzierung, Proliferation, Adhäsion und Überleben von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen nehmen (Henschler und Mertelsmann, 1993; Cottner et al., 1994; Keller et al., 1995; Kittler et al., 1992; Verfaillie, 1993; Breems et al., 1997). Die verschiedenen Typen reifer, peripherer Blutzellen leiten sich von einer kleinen Population pluripotenter Stammzellen ab, die während einer kurzen Phase der embryonalen Entwicklung gebildet und die Hämatopoese aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung ein Leben lang aufrechterhalten können. Diese Zellen entstehen während der Entwicklung des Embryos zuerst im Dottersack (*engl. yolk sac*), später lassen sie sich in der fötalen Leber und im Nabelschnurblut nachweisen. Im adulten Organismus befinden sich diese Stammzellen hauptsächlich im Knochenmark, sie

sind jedoch auch in niedrigen Konzentrationen (ca. 0,1%) im peripheren Blut zu finden. Aufgrund der begrenzten Lebensdauer der reifen, funktionstüchtigen Blutzellen, ist das hämatopoetische System kontinuierlich gefordert "alte" durch "neue" Zellen zu ersetzen. Darüber hinaus ist das hämatopoetische System in der Lage, auf Stresssituationen, z. B. Blutverlust oder Infektionen, schnell und kontrolliert zu reagieren.

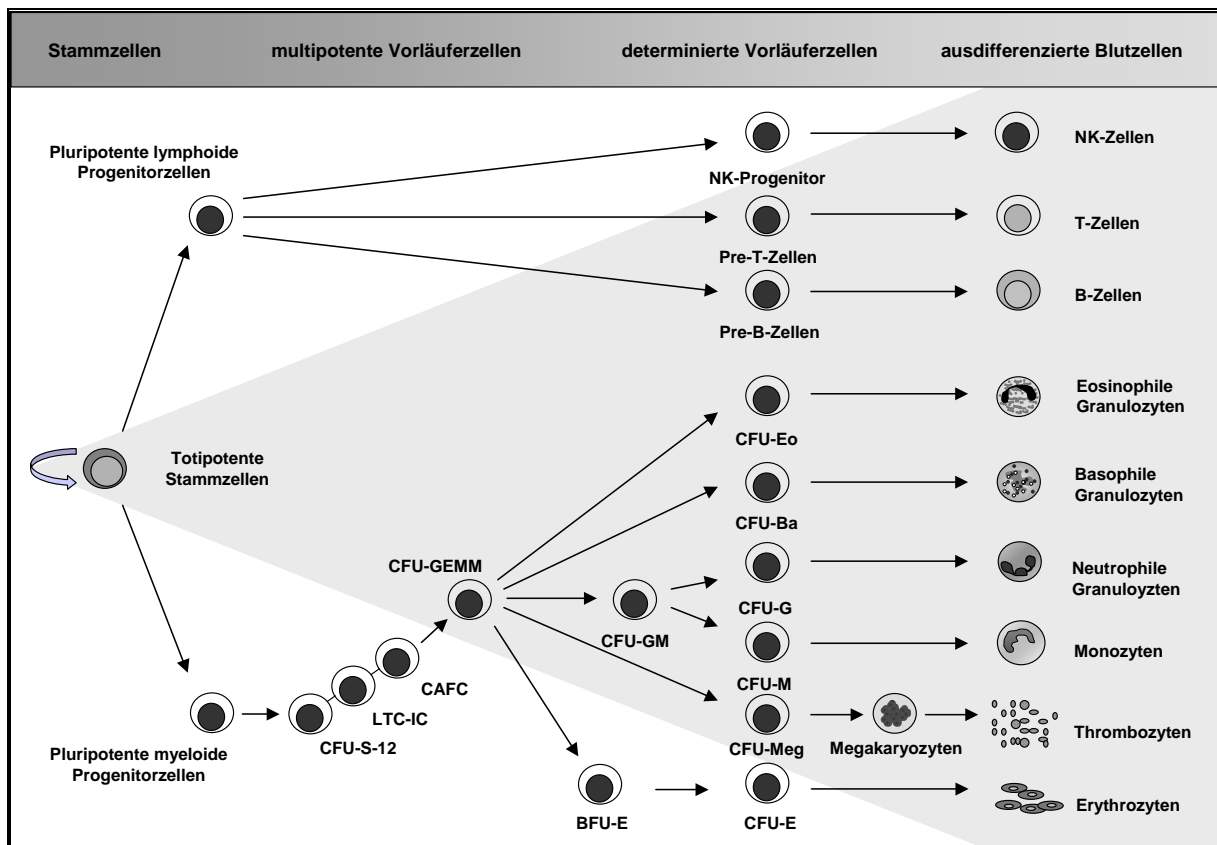


Abbildung 1.1: Aktuelle Hypothese des Stammbaums der vertebralen Hämatopoese (nach Sandstrom et al., 1994, verändert).

1.1.1 Aufbau des hämatopoetischen Systems

Die Bedeutung des Knochenmarks für die Blutbildung wurde erstmals von Neumann 1868 beschrieben (Neumann, 1868; Neumann, 1869). Das Schema der Blutbildung wurde 1909 durch den russischen Arzt Maximov als Hypothese während einer Vorlesung an der Berliner Charité entwickelt und in der *Folia Haematologica* publiziert (Maximov, 1909). Der Nachweis, dass eine blutbildende Stammzelle tatsächlich in der Lage ist, alle Blutzelltypen zu generieren, gelang erst 71 Jahre

später mit Hilfe von *in vitro* Experimenten (Messner et al., 1980). Diese Stammzellen wurden im Knochenmark und peripherem Blut nachgewiesen und stellen einen Anteil von 1 bis 3% bzw. ca. 0,1% der kernhaltigen Zellen dar. Es wird angenommen, dass wenige, vielleicht einige 100 bis 1000, der sehr unreifen Stammzellen ausreichen, um die gesamte Blutbildung eines Menschen ein Leben lang zu gewährleisten. Das momentane Verständnis der Hämatopoese begründet sich auf Schlüsselexperimente von Paul Ehrlich (hierarchisches Konzept; Ehrlich, 1879) und Arthur Pappenheim (Vorläuferzellen im Knochenmark und Zelllinienspezifität; Pappenheim, 1898). Nach einem Jahrhundert der Diskussion und Experimente hat sich das hierarchische Modell der Hämatopoese, mit seinen neun Hauptzelltypen etabliert (siehe Abb. 1.1). Die Blutzellpopulation ist in zwei Hauptgruppen unterteilt: die myeloide und lymphoide Reihe. Der myeloiden Reihe werden Erythrozyten, Monozyten/Makrophagen, neutrophile, eosinophile, basophile Granulozyten und Thrombozyten zugeordnet. Auf der anderen Seite bilden z. B. Natürliche Killerzellen, die Thymus-abgeleiteten T-Zellen und die Knochenmark-abgeleiteten B-Zellen die lymphoide Reihe. Nähere Ausführungen zur Funktion und Reifung der verschiedenen Zelltypen sind bei Ostendorf, 1991 zu finden. Hämatopoetische Vorläuferzellen oder Progenitoren sind uni-, bi- oder multipotent allerdings nicht pluripotent, d.h. sie sind nicht in der Lage sowohl myeloide als auch lymphoide Zellen zu generieren. Sie sind in der Lage die Proliferation und Differenzierung nur in Richtung eines Zelltyps oder einiger weniger bestimmten Zelltypen in linearer Sequenz durchzuführen (deterministisches Modell; Brown et al., 1991).

1.1.2 Charakterisierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen

Zur Charakterisierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen sind eine Reihe von Methoden entwickelt. Die Methoden lassen sich in zwei Gruppen zusammenfassen: 1. die phänotypische Charakterisierung anhand unterschiedlicher Kombinationen monoklonaler Antikörper z. B. zeitnah im Durchflusszytometer und 2. die funktionelle Charakterisierung des biologischen Potentials anhand von *in vitro* Kulturassays oder Tierversuchen.

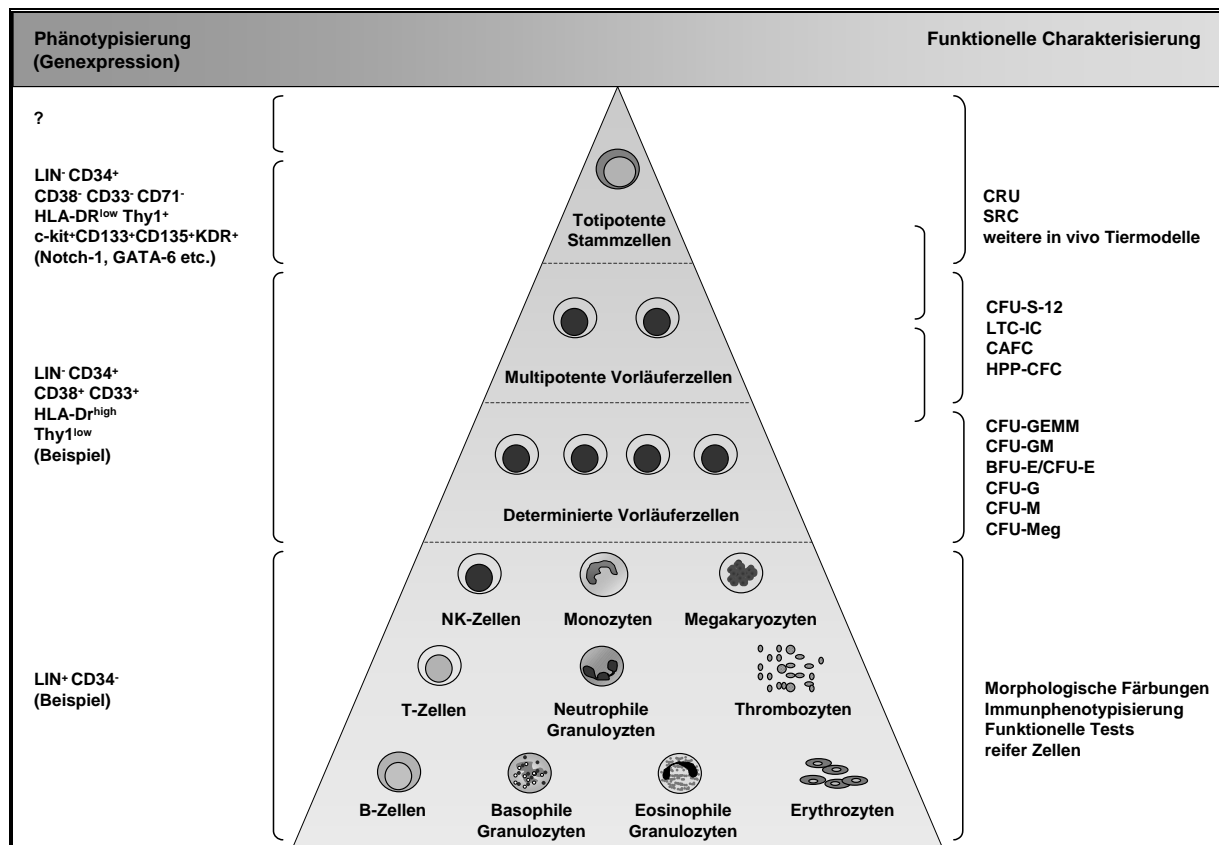


Abbildung 1.2: Phänotypisierung und funktionelle Charakterisierung von hämatopoetischen Zellen (nach Jelinek, 2001, verändert).

1.1.2.1 Phänotypisierung von hämatopoetischen Stammzellen

Vor 20 Jahren veröffentlichten Curt Civin und seine Arbeitsgruppe einen Artikel, in dem sie einen neuen monoklonalen Antikörper beschrieben, den My 10, der ursprünglich durch die Immunisierung von Balb/c Mäusen mit Zellen der undifferenzierten, kontinuierlichen KG-1a-Zelllinie gewonnen wurde (Civin et al., 1984). Dieser Antikörperklon wurde sehr bald durch die „Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshops“ als Prototyp des CD34-Antikörpers klassifiziert. Monoklonale CD34-Antikörper detektieren ein transmembranes Glykoprotein, das auf einer kleinen Population von humanen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird. Morphologisch als differenziert anzusehende Zellen zeigen die Expression dieses Antigens nicht. Funktionelle Assays zeigen eindeutig, dass Vorläuferzellen, wie z. B. CFU-GM, BFU-E oder CFU-Meg ausschließlich in der CD34-positiven Population zu finden sind (Kinniburgh et al., 1993). Weiterhin sind LTC-IC in der CD34-positiven Population angereichert, während in der CD34-negativen keine nachzuweisen sind (Lemoli et al., 2003). Allogene Transplantationsexperimente nach Myeloablation in

nicht-humanen Primaten konnten zeigen, dass sich die klinisch relevante Knochenmark rekonstituierende Aktivität (MRA - Marrow Repopulating Activity) innerhalb der CD34-positiven Zellpopulation befindet (Andrews et al., 1992). Die Identifizierung dieses Markers ermöglichte Mitte der 1990er Jahre die Entwicklung von Selektionstechniken CD34-positiver Zellen und deren Einsatz vor dem Hintergrund der Konzentrierung dieser Zellen bei gleichzeitiger Abreicherung von kontaminierenden allogenen T-Zellen sowie von autologen Tumorzellen (Chabannon et al., 1998; Schiller et al., 1995). Das CD34-Antigen wird bis heute ebenfalls als Surrogatmarker für die Qualität eines hämatopoetischen Transplantates und auch zur Quantifizierung von Stammzellen in peripherem Blut herangezogen. Weiterhin korreliert die Anzahl infundierter CD34-positiver Zellen mit der Erholung der Zahlen der neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten nach Transplantation von peripheren Blutstammzellen (Bensinger et al., 1995) und Nabelschnurblut (Migliaccio et al., 2000). In der täglichen Transplantationspraxis wird für eine sichere durchflusszytometrische Identifizierung von CD34-positiven Stamm- und Vorläuferzellen die Koexpression des CD45-Antigens, dem Panleukozytenmarker, sowie ein charakteristisches Vorwärts-/Seitwärtsstreulichtsignal herangezogen. Die Quantifizierung ist in international anerkannten Konsensusprotokollen standardisiert (Sutherland et al., 1996).

Da der Expressionslevel des CD34-Antigens auf Einzelzellen keine genaue Unterscheidung zwischen frühen, unreifen Stammzellen und determinierten Vorläuferzellen erlaubt, wurden weitere Stammzellmarker identifiziert. Eine Vielzahl weiterer Antigene wurde darauf von verschiedenen Autoren angeboten, wie z. B. CD38-Negativität (Kamel et al., 2005), CD71-Negativität (Cotner et al., 1989), CD33-Negativität (Kamel et al., 2005), KDR-Expression (VEGFR-2, Ziegler et al., 1999; Katoh et al., 1995; Böldicke et al., 2001), CD90-Expression (Blair et al., 1997), CD117-Expression (c-Kit, SCF-Rezeptor), CD133-Expression (Yin et al., 1997; Peichev et al., 2000; Matsumoto et al., 2000), CD135-Expression (Flt3-Ligand Rezeptor; Rappold et al., 1997), HLA-DR-Negativität (Miller et al., 1992; Kamel et al., 2005) oder die Expression des Chemokinrezeptors CXCR-4 (Mohle et al., 1998).

Allgemein anerkannt ist das Fehlen einer Reihe von Antigenen (Lin⁻ = Lineage Negative Cells) die spezifisch von reifen Blutzelltypen exprimiert werden (Koller et al., 1995a). Ein Teil der genannten Antigene und ihre definitionsgemäße Zuordnung zu verschiedenen Differenzierungsstadien von Stamm- und Vorläuferzellen sind in

Abbildung 1.2 gezeigt. Ende der 1990er Jahre wurden die ersten Hinweise veröffentlicht, dass das CD34-Antigen möglicherweise nicht geeignet ist, sehr unreife Stamm- und Vorläuferzellen nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass auch CD34⁻CD38⁻Lin⁻-Zellen aus Nabelschnurblut in der Lage sind die Hämatopoese in subletal bestrahlten NOD/SCID-Mäusen wieder aufzubauen (Bhatia et al., 1998). Goodell und seine Gruppe haben bereits 1997 Hinweise auf eine CD34-negative Zellpopulation gefunden, die nach *in vitro* Kultur in Gegenwart von Stromazellen in CD34-positive Zellen differenzieren und einen hohen Gehalt an LTC-IC aufweisen (Goodell et al., 1997). Auch in humanem Knochenmark konnten CD34-negative Zellen mit ähnlichem Potential identifiziert werden (Zanjani et al., 1998). Eine umfangreiche Übersicht zu CD34-negativen hämatopoetischen Stammzellen ist bei Guo et al. (2003) zu finden.

1.1.2.2 Funktionelle Charakterisierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen

Zur Analyse der biologischen Funktion von Stamm- und Vorläuferzellen sind eine Reihe von *in vivo* Assays beschrieben, die auf Tierexperimenten aufbauen. Im SRC-System (SCID Repopulating Cell-System) wird eine Progenitorzellsuspension aufeinander folgend in 2 syngene, subletal bestrahlte NOD/SCID-Mäuse injiziert. Nach Rekonstitution der Hämatopoese im ersten Tier werden Knochenmarkzellen isoliert und auf das zweite Tier übertragen. Der Nachweis von SRCs gilt als geführt, wenn im zweiten Tier ebenfalls myeloide und lymphoide Hämatopoese nachgewiesen werden kann (Ramirez et al., 1998; Verstegen et al., 1998; Conneally et al., 1997; Verlinden et al., 1998). Eine Modifikation des Systems (SCID-Human Model) sieht die Implantation von humanem Gewebe, Thymus, Knochen oder Leber, in Versuchstiere vor. Die Testzellsuspensionen können auf diese Weise in humanes Gewebe transplantiert werden (McCune et al., 1988; Fraser et al., 1995; Peault et al., 1993). Eine weitere Modifikation stellt die Kotransfusion von Progenitorzellen mit humanen Knochenmarkstromazellen in BNX-Mäuse (Beige-Nude-SCID-Model) dar (Nolta et al., 1996). Im technisch aufwendigen Human-/Sheep-Xenograft-Model werden Progenitorzellsuspensionen intrauterin in Schafe transplantiert. Nach Geburt des Tieres kann die Ausbildung des hämatopoetischen Chimärismus oft über Jahre hinweg analysiert werden (Shimizu et al., 1998; Zanjani et al., 1997).

Als Ersatz für Tierversuche wurden *in vitro* Assays entwickelt, um von Stamm- und Progenitorzellen abgeleitete myeloide (Breems et al., 1994) und lymphoide (Whitlock und Witte, 1982) Zelldifferenzierung zu demonstrieren. Kurzzeitkulturen von Vorläuferzellen in semisoliden Medien unter Zugabe von rekombinanten Wachstumsfaktoren sind geeignet determinierte Vorläuferzellen, Colony-Forming Units (CFU), myeloider Zellen nachzuweisen. Dabei entstehen nach 14 Tagen Kultur Kolonien mit charakteristischer Morphologie, die eine semiquantitative Ableitung der determinierten Vorläuferzellen erlauben (Williams et al., 1987; McNiece et al., 1989; McNiece et al., 1988).

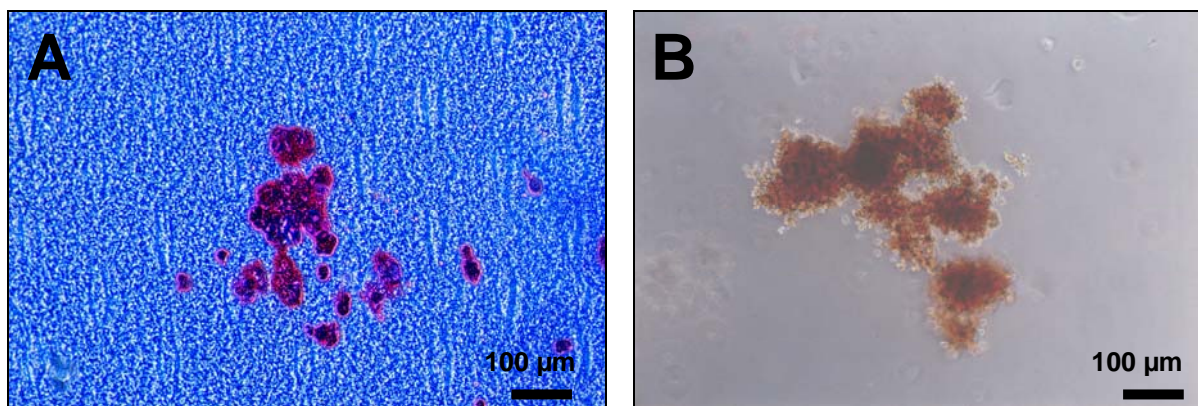


Abbildung 1.3: Koloniemorphologie determinierter hämatopoetischer Vorläuferzellen: CFU-Meg in Kollagenmatrix, immunhistochemische anti-CD41-APAAP-Färbung sowie Gegenfärbung mit Trypanblau (A) und lichtmikroskopisch sichtbare BFU-E in semisolidem Medium (B) jeweils nach 14 Tagen Kultur.

Kulturbedingungen, die geeignet sind frühe Vorläuferzellen nachzuweisen, basieren meistens auf einer Kokultur mit murinen oder humanen Fütterungszellen (*engl.* Feeder Cells). Dabei kommen sowohl primäre Knochenmarkfibroblasten (Stromazellen) als auch geeignete Zelllinien zum Einsatz. Die beiden am weitesten verbreiteten Assays sind der CAFC- (Cobblestone-Area Forming Cell)- und der LTC-IC (Long-Term Culture-Initiating Cell)-Assay. Es werden in beiden Fällen Progenitorzellsuspensionen im Mikrotiteransatz in Verdünnungsreihen kultiviert, um eine statistische Auswertung auf der Basis eines LDA (Limiting Dilution Assay) zu ermöglichen. Ziel ist die Ermittlung der entsprechenden Grenzverdünnungsrate, die statistische Rückschlüsse auf die Frequenz der Stammzellpopulation erlaubt. Die mathematischen Grundlagen wurden von Carl Taswell bereits 1981 erarbeitet (Taswell, 1981). Im Fall des CAFC-Assays wird die Grenzverdünnungsstufe durch das Fehlen von Kolonien mit spezifischer Kopfsteinpflaster-Morphologie innerhalb

einer Verdünnungsstufe nach 5-wöchiger Kultur ermittelt (Ploemacher et al., 1989; Ploemacher et al., 1991). Der Endpunkt des LTC-IC-Assay sieht nach 5 Wochen Kultur eine Überführung der Zellen aus dem Mikroansatz in einen CFU-Assay vor. Nach einer weiteren 14-tägigen Kultur wird die Grenzverdünnungsrate über das Fehlen von sekundären CFU definiert (Sutherland et al., 1989; Verfaillie et al., 1990). Die Zahl von CAFC oder LTC-IC nach 5 Wochen Kultur korreliert mit der Zahl an CFU-S-12 (Colony-Forming Unit-Spleen), einem *in vivo* Assay, der bereits 1991 von Breems und Mitarbeitern beschrieben wurde und als Endpunkt das Erscheinen von humanen hämatopoetischen Kolonien in der murinen Milz definiert (Ploemacher et al., 1991).

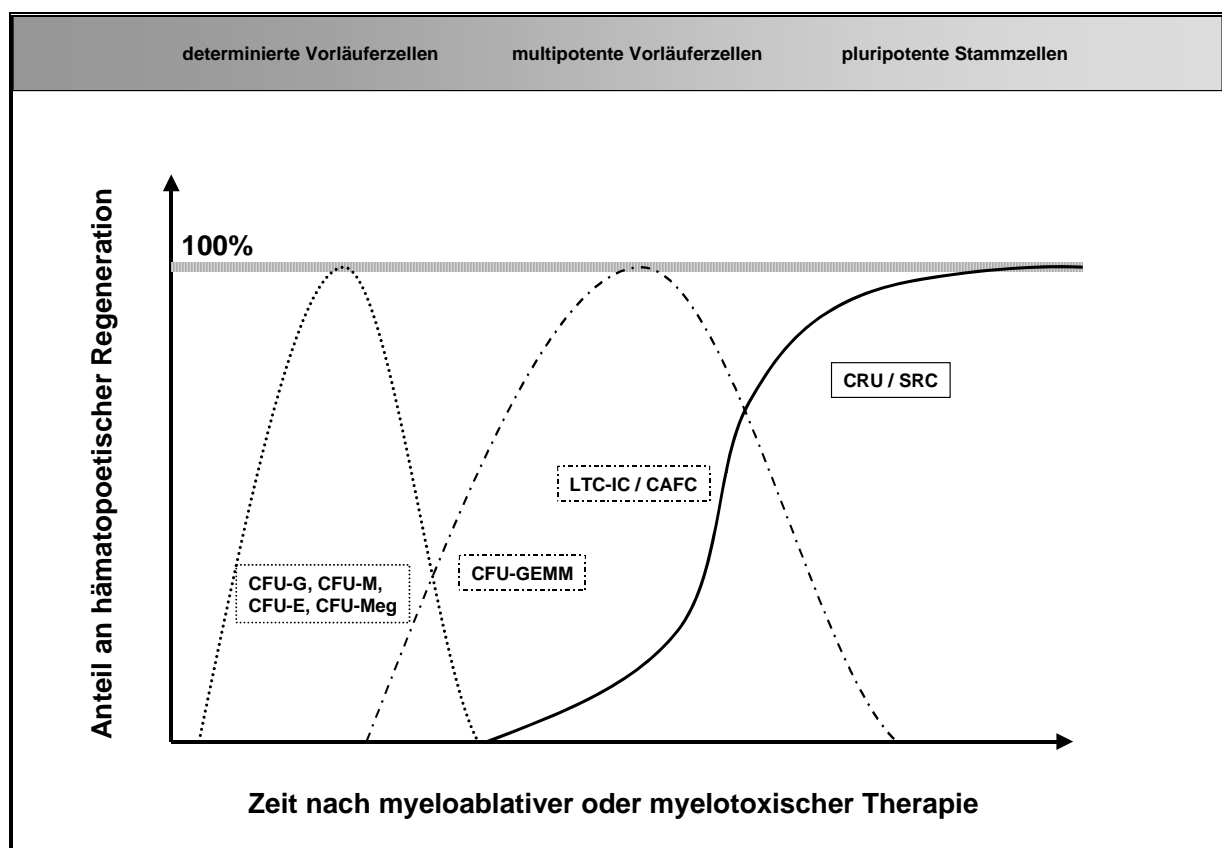


Abbildung 1.4: Beiträge einzelner Zelltypen zur hämatopoetischen Regeneration.

Ein *in vitro* Kulturassay (ML-IC, Myeloid-Lymphoid-Initiating Cell) der den parallelen quantitativen Nachweis von myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen führt, wurde von Theunissen und Verfaillie 2005 beschrieben (Theunissen und Verfaillie, 2005). Der auf Einzelzellbasis aufbauende Kulturtest kann multilineare Hämatopoese nachweisen. Die ML-ICs können LTC-IC und NK-IC (Natural Killer Cell-Initiating Cell) initiieren. Zur Beurteilung der biologischen Funktionalität der Zellen ist in Abbildung 1.4 eine Hypothese zum Beitrag der verschiedenen Populationen zur Rekonstruktion

der Hämatopoese nach myelotoxischer oder myeloablativer Therapie gezeigt. Ein direkter Vergleich oder eine Umrechnung zwischen den verschiedenen *in vitro* Assays ist aufgrund der artifiziellen und sehr spezifischen *in vitro* Kulturbedingungen fast unmöglich. Große Variabilität wird im Bereich der Langzeitkulturen erzeugt. Die CAFC-Woche-5 und LTC-IC-Woche-5, unterscheiden sich einerseits durch die Beschaffenheit des Feederlayers und andererseits durch die Definition des Endpunktes. Eine teilweise Standardisierung wird im Bereich der Kurzzeitkulturen (CFU-Assays) durch 1. weltweit durch die Hersteller standardisierter Medien durchgeführte Ringversuche und 2. einheitliche Kulturmedien und -bedingungen aufrechterhalten.

1.2 *Transplantation hämatopoetischer Stammzellen*

Die ersten Knochenmarktransplantationen wurden im 20. Jahrhundert durchgeführt. Die frühesten Daten von Tierexperimenten gehen in das Jahr 1922 zurück, als der dänische Wissenschaftler Fabricious-Moeller beobachtete, dass bei Meerschweinchen, die man einer letalen Strahlendosis aussetzte, die üblichen Symptome schwerer Strahlenschäden ausblieben, wenn man die Beine der Tiere gegen Strahlung schützte. 27 Jahre später griff Jacobson die Beobachtungen wieder auf und zeigte, dass man nach der Bestrahlung durch Injektion von Milz- oder Knochenmark einen protektiven Effekt erzielen konnte. Der Effekt der Radioprotektion wurde auf die Neubesiedelung des Empfängers durch Spenderzellen zurückgeführt. Barnes und Loutit entdeckten 1955, dass Mäusen eines Stammes A, die nach Ganzkörperbestrahlung (*engl.* Total Body Irradiation, TBI) syngene Milzzellen von Mäusen des gleichen Stammes erhielten, eine Langzeitüberlebensrate zeigten, während die gleichen Mäuse, die nach TBI allogene Milzzellen von Mäusen eines Stammes B erhielten deutlich früher starben. Barnes und Mitarbeiter führten 1957 darauf den Begriff „Radiation Chimera“ ein. Dieser beschreibt den Zustand, dass nach Ganzkörperbestrahlung und Gabe von Knochenmark in einem Tier die Hämatopoese von den Zellen eines anderen Tieres dauerhaft vermittelt wird. Diese Beobachtung wurde dann bald von vielen anderen Gruppen (van Bekkum, 1957) bestätigt. Doch das auffälligste Merkmal dieser Studien war, dass die Mäuse alle ähnliche pathophysiologische Symptome, wie Hautläsionen oder starke Diarrhöen entwickelten. Der Grund für das Auftreten einer

so genannten „Secondary Disease“ war die Unverträglichkeitsreaktion gegenüber dem infundierten fremden Zellmaterial der „Graft versus Host Disease“ (GvHD). Eine posttransplantäre Komplikation, bei der sich immunkompetente Zellen des Spenders gegen Gewebe des Empfängers richten und die auch heute noch das Hauptproblem bei der allogenen Knochenmarktransplantation (KMT) darstellt.

Da man zu der Zeit bereits über die genetischen Hintergründe des ABO-Blutgruppensystems auf den roten Blutkörperchen Bescheid wusste, aber wenig bekannt war über das Haupthistokompatibilitätsantigen-System (HLA-System), wurde den ersten Patienten Knochenmark von lediglich blutgruppenidenten Spendern infundiert. Es kam zu heftigen Abstoßungsreaktionen und keiner der Patienten überlebte. 1963 berichtete Mathé von einer KMT, bei der zum ersten Mal ein komplettes Anwachsen des Transplantates (*engl.* Engraftment) dokumentiert wurde. Erst als die Bedeutung der Expression der „Major Histocompatibility Complex“ (MHC)-Moleküle des HLA-Systems auf allen kernhaltigen Zellen von Säugern erkannt wurde, begann in den 70er Jahren die moderne Ära der KMT. Als Spender wurden HLA-identische Verwandte der Patienten ausgewählt und die erste erfolgreiche allogene Transplantation wurde von Donall Thomas 1972 am Fred Hutchinson Center in Seattle durchgeführt. Da man heute technisch in der Lage ist hämatopoetische Stammzellen aus peripherem Blut zu gewinnen, ist es nicht mehr unbedingt nötig Knochenmark zu transplantieren. Dabei wurde für die Stammzellgewinnung der so genannte „Reboundeffekt“ nach der Chemotherapie genutzt, der die hämatopoetischen Vorläuferzellen im peripheren Blut nach zytostatischer Therapie deutlich ansteigen lässt (Richman et al., 1976).

1.3 Gewinnung und Isolation von hämatopoetischen Stammzellen

1.3.1 Quellen von Stammzellen

1.3.1.1 Knochenmark

Die Gewinnung von autologem Knochenmark erfolgt in der Regel in Vollnarkose. Durch multiple Knochenmarkaspiration an der Crista iliaca superior (vorderer Beckenkamm) wird das stammzellhaltige Knochenmarkblut gewonnen und heparinisiert. In der Regel werden 800 bis 1500 mL Knochenmarkblut benötigt, um

die geforderte Zahl von mehr als $2 \cdot 10^8 \text{ kg}^{-1}$ Körpergewicht mononukleäre Zellen zu erhalten. Durch Filtration werden Knochensplitter und Fettpartikel entfernt. Grundlegende Anforderung an Herstellung, Testung und Transplantation sind in den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Transplantation von allogenen Knochenmarkpräparaten niedergelegt (Richtlinien für die allogene Knochenmarktransplantation mit nichtverwandten Spendern, Deutsches Ärzteblatt 91, Heft 11 (18.03.1994), S. A-761-762, 764-766). In Tabelle 1.1 sind die wesentlichen Eigenschaften des Knochenmarks im Vergleich zu anderen Stammzellquellen dargestellt.

1.3.1.2 Stammzellapherese

Da unter physiologischen Bedingungen nur sehr wenige hämatopoetische Stammzellen im peripheren Blut zirkulieren, müssen diese aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisiert werden. Dies kann im autologen Fall im Rahmen der Erholung von einer Myelosuppression nach durchgeführter Chemotherapie geschehen, die nicht stammzelltoxisch sein sollte. In der Regenerationsphase steigt die Anzahl der zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen auf ein Vielfaches der normalen Konzentration an. Es kann auch unter der Behandlung mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (G-CSF, Dührsen et al., 1988; GM-CSF, Socinski et al., 1988) erfolgen, unter der ebenfalls Stammzellen aus dem Knochenmark ins Blut mobilisiert werden. Der mobilisierende Effekt des G-CSFs wird hauptsächlich auf seine Wirkung auf folgende Antigene zurückgeführt: VLA-4 (Very Late Antigen-4), VLA-5 (van der Loo et al., 1998), P-Selectin, E-Selectin (Frenette et al., 1998), Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, CXCR-4 (SDF-1, Stromal Derived Factor-1 Rezeptor; Naiyer et al., 1999; Denning-Kendall et al., 2003; Li et al., 2006), LFA-1 (Leucocyte Function-Associated Antigen-1, Peled et al., 2000), CD44 und PECAM-1 (Yong et al., 1998). Die Apherese erfolgt dann mit einem kontinuierlich arbeitenden Zellseparator. Für ein sicheres Transplantat werden mindestens $2 \cdot 10^6 \text{ CD34}^+$ -Zellen kg^{-1} Körpergewicht des Empfängers gefordert. Grundlegende Anforderung an Herstellung, Testung und Transplantation sind in den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Transplantation von allogenen peripheren Blutstammzellen niedergelegt (Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen, Deutsches Ärzteblatt 94, Heft 23 (06.06.1997), Seite A-1584-92). In

Tabelle 1.1 sind die wesentlichen Eigenschaften peripherer Blutstammzellen im Vergleich zu anderen Stammzellquellen dargestellt.

1.3.1.3 Nabelschnurblut

Die Transplantation von Nabelschnurblut (*engl.* Cord Blood, CB), genauer Plazentarestblut, findet immer größere Beachtung bei der kurativen Behandlung von hämatologischen Erkrankungen (Gluckman et al., 1997; Rubinstein et al., 1998).

Tabelle 1.1: Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen aus verschiedenen Quellen

Quelle	Wesentliche Unterschiede	Referenz
Knochenmark	Entnahme unter Narkose	Storb, 1992
	Stammzell dosis ist begrenzt	
	CD34-Gehalt [%]: 1 – 2	
	BFU-E / CFU-GM [10^{-4} MNC]: 11 / 7	Podesta et al., 2001
	CFU-GEMM / LTC-IC [10^{-4} MNC]: 1,7 / 0,4	Podesta et al., 2001
	CAFC [10^{-4} MNC]: 0,03 – 0,1	Breems et al., 1994
G-CSF-mobilisierte periphere Blutstammzellen	Einfache Ambulante Entnahme	Henon et al., 1993
	Nebeneffekte des G-CSF	
	Hohe Stammzelldosen erreichbar	
	Schnelle Rekonstitution	To et al., 1997
	CD34-Gehalt [%]: 0,15 – 2,0	
	BFU-E / CFU-GM [10^{-4} MNC]: 20,4 / 15,2	Podesta et al., 2001
	CFU-GEMM / LTC-IC [10^{-4} MNC]: 2,8 / 0,24	Podesta et al., 2001
Nabelschnurrestblut	Einfache Gewinnung, stellt keine Gefahr für Spenderin dar	Rubinstein et al., 1998
	HLA-mismatch Transplantation ist möglich	Mills et al., 1996; Han und Hodge, 1999
	Begrenzte Anzahl von Stammzellen meist nur für Kinder ausreichend	Cairo und Wagner, 1997
	Höherer prozentualer Anteil an SRC/CFU	Wang et al., 1997; Kim et al., 1999
	Langsamere Rekonstitution	Kogler et al., 1999
	Höheres Proliferationspotential <i>in vivo</i>	Liu et al., 1999
	CD34-Gehalt [%]: 0,4 – 1	
	BFU-E / CFU-GM [10^{-4} MNC]: 20 / 5,2	Podesta et al., 2001
	CFU-GEMM / LTC-IC [10^{-4} MNC]: 2,8 / 0,09	Podesta et al., 2001

Die Idee der Verwendung von CB zu Transplantationszwecken wurde erstmals 1972 von Ende publiziert (Ende et al., 1972). Die erste gerichtete familiär-allogene CB-Transplantation bei einem Kind mit Fanconi-Anämie wurde 1988 von Gluckman in Paris durchgeführt. Im August 1993 fand die erste fremd-allogene CB-Transplantation an der Duke Universität, durchgeführt von J. Kurtzberg, statt (Gluckman und Rocha, 2005). Bis zum Jahr 2004 wurden weltweit 3000 Transplantationen durchgeführt. Die Entnahme des Nabelschnurblutes wird im Kreissaal von geschultem Personal durchgeführt und sieht eine Punktion der Nabelschnurvene unter sterilen Kautelen mit Antikoagulation vor. Grundlegende Anforderung an Herstellung, Testung und Transplantation sind in den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Transplantation von Nabelschnur- und Plazentarestblut festgelegt (Richtlinien zur Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut, Deutsches Ärzteblatt 96, Heft 19 (14.05.1999), Seite A-11297-1304). In Tabelle 1.1 sind die wesentlichen Eigenschaften von Nabelschnurblutzellen im Vergleich zu anderen Stammzellquellen dargestellt.

1.4 Kultivierung hämatopoetischer Zellen

Die wichtigen Ziele einer *ex vivo* Kultivierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen sind:

1. Verbesserung des Engraftments

Im Vordergrund steht die qualitative und quantitative Verbesserung des hämatologischen Transplantates zur Gabe nach myelotoxischer Therapie. Es konnte bereits Mitte der 1990er Jahre gezeigt werden, dass die Ergänzung eines Transplantates durch *ex vivo* kultivierte Vorläuferzellen die Regeneration von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten verbessern kann (Champlin et al., 1995). Weitere Studien untersuchten den Einfluss der Dosis expandierter Zellen auf die Zeit bis zur Erholung der Zellzahlen neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut nach Transplantation (*engl.* Time to Neutrophil Recovery). Sie waren in der Lage diesen als einzigen signifikanten positiven Einflussfaktor zu ermitteln (Paquette et al., 2002). Auch Studien kleinerer Probandenzahl, die speziell das T-Zell-Repertoire adressierten, konnten zeigen, dass expandierte

Zellen alleine eine vollständige Rekonstitution der Hämatopoese bewirken können (Gokmen et al., 2001).

2. Reduktion der Tumorzellbelastung eines autologen Transplantates

Eine Reihe Methoden stehen heute zur Tumorzell-Entfernung (Purging) zur Verfügung. Chemische Methoden, wie 4-HC (4-Hydroxyperoxycyclophosphamid), sind mit einem Verlust von Vorläuferzellen verbunden (Siena et al., 1985). Eine passive Reduktion durch *ex vivo* Kultur ist für Brustkrebs beschrieben (Lundell et al., 1998). Abhängig von der Erkrankung sind auch spezifisch wirkende Antikörper verfügbar, wie der anti-CD52-Antikörper im Fall der chronisch lymphatischen Leukämie (Hale et al., 2002; Hale, 2002). Eine Übersicht zu *in vitro* Purging-Methoden (Methoden zur Entfernung von Tumorzellen) wurde von de Lima und Shpall erstellt (de Lima und Shpall, 2004).

3. Verbesserung der Nutzbarkeit von Nabelschnurblut für erwachsene Patienten

Durch das begrenzte Volumen der Nabelschnurblutpräparate ist das vornehmliche Ziel die Vermehrung der Stamm- und Vorläuferzellen. Weiteres Ziel ist die Erhöhung des Anteils reifer Vorläuferzellen, da trotz des hohen Gehaltes an primitiven Vorläuferzellen transplantierte Patienten nach myelotoxischer Therapie eine verlängerte Phase der Neutro- und Thrombopenie zeigen (von Drygalski und Adamson, 2000).

4. Therapeutische Ansätze auf der Basis von retroviralem Gentransfer

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen sind ein ideales Ziel für gentherapeutische Ansätze, da sie das transduzierte Gen einen langen Zeitraum verfügbar halten und die genetische Information an die abgeleiteten Tochterzellen weitergeben können (Nielsen, 1999). Zwei Beispiele für einen erfolgreichen Gentransfer stellen die Arbeiten von Hacein-Bey-Abina und Aiuti auf dem Gebiet der X-chromosomalen Form der schweren kombinierten Immundefizienz (X-linked SCID) bzw. Adenosin-Deaminase-Defizienz assoziierten schweren kombinierten Immundefizienz (ADA-SCID) dar (Aiuti et al., 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2002).

In der folgenden Tabelle 1.2 befindet sich eine Übersicht zu klinisch eingesetzten *ex vivo* expandierten Knochenmark- und peripheren Blutstammzellpräparaten.

Tabelle 1.2: Übersicht zu klinisch eingesetzten *ex vivo* kultivierten Knochenmark- und peripheren Stammzellpräparaten

Referenz	Anzahl Patienten	Zellmaterial	Zytokine	Kulturmedium	Kulturdauer	Transplantat kombiniert/ expandierte Zellen
Alcorn et al., 1996	10	selekt. CD34 PBMNC	SCF, IL-1 β , IL-3, IL-6, EPO	autolog. Serum	8	kombiniert*
Brugger et al., 1995	10	selekt. CD34 PBMNC	SCF, IL-1 β , IL-3, IL-6, EPO	RPMI 1640, 2% autolog. Plasma	12	kombiniert und nur expandierte*
Engelhardt et al., 2001	10	KM	pIXY 321, Flt-3 Ligand, EPO, TPO	IMDM 10% FCS, 2% HS	12	nur expandierte*
Holyoake et al., 1997	4	selekt. CD34 PBMNC	SCF, IL-1 β , IL-3, IL-6, EPO	autolog. Serum	8	nur expandierte*
McNiece et al., 2000a	21	selekt. CD34 PBMNC	SCF, G-CSF, MGDF	Medium von Amgen ¹	10	kombiniert und nur expandierte*
Naparstek et al., 1992	20	KM	GM-CSF, IL-3	RPMI, 7 –10% HSA	4	kombiniert
Paquette et al., 2000	24	PBMNC	SCF, G-CSF, MGDF	Medium von Amgen ¹	9	kombiniert*
Reiffers et al., 1999	14	selekt. CD34 PBMNC	SCF, G-CSF, MGDF	Medium von Amgen ¹	10	kombiniert*
Stiff et al., 2000	19	KM	pIXY 321, Flt-3 Ligand, EPO	IMDM, 10% FBS, 2% HS	12	nur expandierte*
Williams et al., 1996	9	selekt. CD34 PBMNC	pIXY 321	X-Vivo 10, 1% HSA	12	kombiniert*

Legende: PB – mobilisiertes peripheres Blut, KM – Knochenmark, * – Gabe von G-CSF nach Transplantation, ¹ – Hersteller Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA, Zusammensetzung nicht veröffentlicht, HS – Horse Serum, Pferdserum, MGDF – Megacaryocyte Growth and Development Factor.

1.4.1 Kultivierungstechniken und Kulturparameter

Wie bereits beschrieben ist jeder einzelne Schritt der Hämatopoese hoch reguliert und unterliegt *in vivo* der Kontrolle des Mikromilieus des Knochenmarks. Dies beinhaltet nicht nur die Auswahl der Inhaltsstoffe des Kulturmediums, sondern auch die Gelöstsauerstoff-Konzentration, den pH-Wert, die Osmolarität des Serums, die Versorgung mit Nährstoffen und die Entfernung von Metaboliten sowie Interaktionen mit der molekularen und zellulären Umgebung der Zellen (Zell-Zell-Kontakt, Adhäsionsmoleküle und Extrazelluläre Matrix). Diese Parameter bestimmen in der

Summe über das Schicksal der Zellen (Noll et al., 2002). Im Folgenden sollen diese hohen, spezifischen Anforderungen an das Kultursystem dargelegt werden.

1.4.2 Physikochemische Kulturparameter

1.4.2.1 Der Gelöstsauerstoff-Partialdruck

Der Gelöstsauerstoff-Partialdruck im Knochenmark konnte bereits Anfang der 1960er Jahre mit 10 bis 50 mmHg ermittelt werden (Lindop und Rotblat, 1960). Diese Werte entsprechen einem 6- bis 36%igem Sauerstoffpartialdruck bei Normaldruck und bezogen auf die Luftsättigung. Bereits seit Ende der 1970er Jahre gibt es Hinweise, dass die Formierung von hämatopoetischen Kolonien, hinsichtlich Anzahl und Größe bei verringertem Sauerstoffgehalt der Kultivierungsatmosphäre zunimmt (Bradley et al., 1978). Die Reduktion des Sauerstoff-Partialdrucks von 20 auf 1 bis 5% Luftsättigung ermöglicht eine bessere Erhaltung und höhere Expansion von Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschnurblut, Knochenmark und mobilisierten peripheren Blutstammzellen (Ivanovic et al., 2000; Koller et al., 1992; Reykdal et al., 1999; Hermitte et al., 2005). Untersuchungen zur Differenzierung von CD34-positiven Progenitorzellen in sauerstoffreduzierter Atmosphäre zeigen einen positiven Effekt auf erythrozytäre (Muench et al., 1992) und granulozytäre Differenzierung (Hevehan et al., 2000). Einen inhibierenden Effekt hingegen scheinen niedrige Sauerstoff-Partialdrücke auf die Differenzierung von Megakaryozyten zu haben. Mostafa und Mitarbeiter konnten anhand von humanen Knochenmarkkulturen sowohl eine Reduktion der Zahl der megakaryozytären Progenitorzellen als auch eine retardierte Differenzierung demonstrieren (Mostafa et al., 2000). Laluppa und ihre Mitarbeiter haben tendenziell dieselben Auswirkungen niedriger Sauerstoff-Partialdrücke auf die Differenzierung von Progenitorzellen gefunden und haben weiterhin einen Einfluss auf die Wirkung von Wachstumsfaktoren identifiziert (Laluppa et al., 1998). Hermitte und Mitarbeiter konnten zeigen, dass CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut bei Gelöstsauerstoffkonzentrationen unter 0,1% bevorzugt in die G₀-Phase eintreten, die einen Steady-State-Zustand der Stammzellpopulation darstellt. Die Fähigkeit zum Engraftment in NOD-SCID-Mäusen war nach dreitägiger Kultur im Vergleich zu Kulturen bei 20% Gelöstsauerstoffkonzentration jedoch nicht beeinträchtigt.

1.4.2.2 Der pH-Wert

Der Einfluss des pH-Wertes ist stark ausgeprägt, offenbar sind sehr enge Grenzen erforderlich und es lassen sich für die Proliferation von unterschiedlichen Progenitorzellen spezifische Optima finden. Zipori und Sasson haben bereits 1981 grundlegende Untersuchungen anhand von murinem Knochenmark durchgeführt und einen optimalen Bereich von pH 6,5 bis 8,0 ermittelt (Zipori und Sasson, 1981). Messergebnisse im Menschen zeigen im arteriellen System einen pH-Wert von 7,4 und im venösen Blut von 7,37. Eine ausführliche Analyse des Einflusses des pH-Wertes auf die granulozytäre und erythrozytäre Differenzierung wurde von McAdams durchgeführt (McAdams et al., 1997). Er ermittelte für die granulozytär-monozytäre Differenzierung ein pH-Wert-Optimum von 7,2 bis 7,4 und zeigt eine komplette Inhibierung unterhalb eines pH-Wertes von 6,7. Das Optimum für die erythrozytäre Differenzierung liegt etwas höher und die Tendenz steigt im Bereich von 7,1 bis 7,6 an. Unterhalb von pH 7,1 ist die Differenzierung stark unterdrückt, jedoch ohne einen negativen Einfluss auf zelluläre Vitalitätsparameter zu zeigen (McAdams et al., 1996a; McAdams et al., 1998). Hevehan und seine Mitarbeiter haben den Einfluss auf die Differenzierung und die Proliferation von granulozytären Progenitorzellen untersucht. Sie konnten für eine pH-Wert-Reduktion in den Bereich von 7,0 bis 7,15 sowohl eine verstärkte Proliferation als auch eine Erhöhung der G-CSF-Rezeptordichte auf den Zellen zeigen (Hevehan et al., 2000). Bei hohen Zelldichten oder nach langer Kulturzeit kann es aufgrund der Stoffwechselprodukte der Zellen, z. B. Kohlendioxid (CO_2) oder Milchsäure, zu einer Ansäuerung des Mediums kommen. Die Standardformulierungen der gängigen Zellkulturmedien sehen aus diesem Grund über das Karbonat-Puffersystem einen Regelungsmechanismus über den CO_2 -Gehalt der Begasungsatmosphäre vor.

1.4.2.3 Die Osmolarität

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen sind wie alle Säugetierzellen sehr sensitiv gegenüber Veränderungen der Medienosmolarität. Der optimale Bereich für eine Kultivierung sowohl mononukleärer Zellen als auch CD34-positiver Zellen liegt zwischen 310 und 320 mOsmol $\text{kg}^{-1}\text{H}_2\text{O}$ (McAdams et al., 1997). Schmidt konnte eine im Vergleich zu mononukleären Zellen höhere Sensitivität von CD34-

aufgereinigten Populationen gegenüber einem Verlassen dieses Bereiches feststellen (Schmidt, 2000). Weiterhin konnte er auf der Ebene der CFU Unterschiede erkennen: niedrigere Osmolaritäten ($290 \text{ mOsmol} \cdot \text{kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$) sind besser für die granulozytär-monozytären Vorläuferzellen und leicht erhöhte Werte, $340 \text{ mOsmol} \cdot \text{kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$, eher für erythrozytäre Vorläufer. Besondere Aufmerksamkeit ist daher Mikrotiter-Ansätzen bzw. kleinvolumigen Bioreaktoren zu widmen, die mit hohen Begasungsraten, von z. B. 0,5 bis 1 vvm, betrieben werden, da geeignete Maßnahmen zur Verhinderung einer Aufkonzentrierung des Mediums durch Evaporation ergriffen werden sollten.

1.4.2.4 Die Temperatur

Initiale *in vitro* Langzeitkulturen Anfang der 1980er Jahre mit Mausknochenmark ergaben erste Hinweise, dass eine Temperaturreduktion von 37° auf 33° C zu einer besseren Erhaltung des Stammzellcharakters der Vorläuferzellen führte (Dexter, 1984). Mit humanem Knochenmark hingegen konnten durch Dexter und seine Mitarbeiter bessere Ergebnisse bei 37° C beobachtet werden. Podesta et al., 2001, konnte ebenfalls anhand eines Vergleiches der Kultur von LTC-IC aus verschiedenen Quellen zeigen, dass Zellen aus Nabelschnurrestblut bei 37° C besser erhalten bleiben als bei 33° C . Dieser Trend konnte auch für LTC-IC, die aus Knochenmark oder peripherem Blut gewonnen wurden, tendenziell bestätigt werden.

1.4.3 Kulturmedien

Seit den Experimenten von Ross Grenville Harrison (1907), der als Begründer der Gewebekultur gilt, wurden Zellen in verschiedenen Nährmedien gezüchtet. In aller Regel enthielten diese komplexe, chemisch-undefinierte, nicht-standardisierte Zusätze wie Serum, Hefeextrakt und Fleischhydrolysate. Das erste chemisch definierte Medium entwickelte Eagle 1955. Es enthält eine Vielzahl niedermolekularer Substanzen, welche das Wachstum mehrerer Zelllinien *in vitro* ermöglicht (Eagle, 1955). Ham arbeitete bereits 1974 an dem Ansatz für die individuellen Bedürfnisse verschiedener Zelllinien fein-ausbalancierte Medien-Kompositionen zu erstellen, in denen die einzelnen Komponenten auch quantitativ aufeinander abgestimmt sind

(Ham, 1974). Ham und McKeehan haben dann nach weiteren Studien 1979 ein aus der Enzymtechnik abgeleitetes Modell formuliert, welches von einer dreiteiligen Wachstums-Reaktions-Kurve mit einem Konzentrationsoptimum für jede Medienkomponente ausgeht. Für die Kultur hämatopoetischer Stammzellen aus Knochenmark erkannten Dexter und Mitarbeiter 1977, dass eine Temperaturreduktion auf 33° C, die Auswahl von Serumzusätzen, eine regelmäßige Erneuerung des Kulturmediums sowie die Konditionierung von Kulturüberständen mit Knochenmarkfibroblasten entscheidende Einflüsse auf die Kultur von murinen und humanen hämatopoetischen Zellen haben können (Dexter et al., 1977).

Den traditionellen Medien für die Kultur von hämatopoetischen Zellen wird tierisches Serum zugegeben, um das Fehlen von essenziellen Inhaltsstoffen zu kompensieren (Gartner und Kaplan, 1980; Dexter und Lajtha, 1974). Die Zusammensetzung von tierischen Seren ist undefiniert und unterliegt großen chargenbezogenen Schwankungen (Baker et al., 1988). Dies erschwert die Standardisierung von Kulturbedingungen und die Interpretation von Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen. Serum ist eine Quelle von essenziellen Nährstoffen, es verbessert durch Transportmoleküle wie z. B. Lipoproteine oder Transferrin ihre Verfügbarkeit und enthält Hormone, Antioxidantien, Lipide für die Zellwandsynthese und Wachstumsfaktoren (Sandstrom et al., 1994). Der Einsatz von tierischen Seren ist für den klinischen Einsatz der kultivierten Zellen unerwünscht, da darüber hinaus nicht-humane Proteine mit immunogenem Potential in den Patienten eingebracht werden können und die Gefahr einer Übertragung humanpathogener Viren oder Prionen besteht (Merten, 1999). Die ersten allgemeinen Studien zur Substitution von Serumfunktionen in Zellkulturmedien wurden in den 1970er Jahren von Barnes und Sato durchgeführt (Barnes und Sato, 1980). Guilbert und Iscove berichteten zuerst, dass Selenit, Transferrin, Albumin und Lecithin Serum bei der Kultur von CFU-E und CFU-GM teilweise ersetzen kann (Guilbert und Iscove, 1976; Iscove et al., 1980). Iizuka und Murphy konnten ebenfalls den essenziellen Charakter des Transferrins für die granulozytär-monozytären Vorläuferzellen nachweisen (Iizuka und Murphy, 1986). Cormier und seine Mitarbeiter haben die Kurzzeitkultur von BFU-E und CFU-GEMM vor allem durch Zusatz von Erythropoetin optimieren können (Cormier et al., 1985). Ende der 1980er Jahre wurde das erste serumfreie Medium entwickelt, das geeignet war Vorläuferzellen über einen Zeitraum von 4 Wochen zu erhalten. Es basierte auf IMDM und enthielt bovines Serumalbumin, humanes Transferrin,

bovines Insulin, Sojabohnenlecithin, Cholesterin, Hydrocortison und Alpha-Thioglycerin (Drouet et al., 1989). Eine Übersicht über die eingesetzten Basalmedien, sowohl der klassischen Zellkulturmedien, wie RPMI 1640, IMDM, DMEM, McCoy's 5A, α -MEM, BME, Fischer's Medium, Medium 199 und der modernen, spezifisch für die Kultur von hämatopoetischen Stammzellen entwickelten Medien wie Stempro-34, CellGro SCGM, X-Vivo 10, X-Vivo 15, X-Vivo 20, QBSF-60, StemSpan SFM oder H2000 sind in Tabelle 1.3 zu finden. In Tabelle 1.2 sind Kulturmedien angegeben, die bereits im Rahmen von klinischen Applikationen für die *ex vivo* Kultur eingesetzt wurden. Die Identifizierung und Verfügbarkeit spezifisch wirkender, rekombinanter Wachstumsfaktoren brachte einen entscheidenden Fortschritt in der Kultur hämatopoetischer Stammzellen. Da bis zum heutigen Tag nicht alle essenziellen, löslichen Faktoren für die Kultur von Stamm- und Vorläuferzellen bekannt sind, soll die Notwendigkeit des Zusatzes von Wachstumsfaktoren als Alternative oder Ergänzung zur stromahaltigen Kultur in den nächsten Abschnitten erläutert werden.

1.4.4 Wachstumsfaktoren vs. Kokultivierungsstrategien

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren, überwiegend die Interleukine und die so genannten „Colony Stimulating Factors“ (CSFs), sind Mitglieder einer Familie von Glykoproteinen, die unerlässlich für die hämatopoetische Kultur sind. Während stromazellhaltige Kulturen eine endogene Produktion dieser Proteine aufweisen, sind die klassischen Suspensionskulturen auf die exogene Gabe angewiesen. Die Auswahl der Kombination von Wachstumsfaktoren stellt ein komplexes Problem dar und ist absolut entscheidend für den Erfolg. Der Einsatz von stromazellkonditioniertem Medium stellt eine Mischform der beiden Strategien, Suspensionskultur und Stromakontaktkultur, dar und wird im Abschnitt 1.4.4.3 detailliert beschrieben.

1.4.4.1 Hämatopoetische Wachstumsfaktoren

Viele Wachstumsfaktoren zeigen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* synergistische als auch antagonistische Effekte. Drei Wachstumsfaktoren scheinen bis heute essenziell

für Überleben und Proliferation von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen: der Stammzellfaktor (SCF, Stem Cell Factor), das Interleukin-3 (IL-3, interleukin 3) und der Flt-3 Ligand (FL, flt-3 ligand). IL-3 verhindert den apoptotischen Zelltod von determinierten Vorläuferzellen und SCF und FL von frühen Stammzellen (Brandt et al., 1994; Takahira et al., 1996). Flt-3 Ligand zeigt strukturelle und funktionelle Homologien zu SCF, ohne dabei auf die Erythropoese zu wirken (McKenna et al., 1995). Der Flt-3 Ligand-Rezeptor ist bekannt in 25 bis 30% aller AML-Patienten konstitutiv aktiviert ist und führt auch in *in vitro* Kultur mit retroviral transduzierten CB CD34⁺-Zellen zu einer Expansion von frühen Stammzellen (Moore et al., 2007). Interleukin-6 aktiviert ruhende frühe Stammzellen zur Proliferation, besonders in Kombination mit SCF (Leary et al., 1988). SCF alleine oder in Kombination mit Flt-3 Ligand scheint wichtig für die Expansion von LTC-IC (Gabbianelli et al., 1995). G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) und Interleukin-11 haben wie IL-6 eine aktivierende Wirkung auf ruhende Zellen. GM-CSF (Granulocyte/Monocyte-Colony Stimulating Factor) zeigt eine sehr breite proliferative Wirkung auf verschiedene Differenzierungsrichtungen, während Erythropoetin (EPO), Thrombopoetin (TPO) und G-CSF starke Mediatoren der Reifung in Richtung der Erythropoese, Thrombopoese bzw. Granulopoese sind (McAdams et al., 1996a). Eine Übersicht zur Auswahl und Kombination der beschriebenen Wachstumsfaktoren ist in Tabelle 1.3 zu finden.

Tabelle 1.3: Übersicht zu *in vitro* Kulturen hämatopoetischer Stammzellen eingesetzten Wachstumsfaktoren

Referenz	Basalmedium	Serum	Wachstumsfaktoren	Zelltyp
Banu et al., 2001	RPMI	+	SCF, Flt-3 ligand, IL-3, IL-6	BM CD34 ⁺
Borge et al., 1997	X-Vivo 15	-	IL-1, IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF, Flt-3 Ligand, SCF, EPO, TPO	BM CD34 ⁺
Case et al., 2001	IMDM + Stempro-34 Zusatz	-	SCF, IL-3, IL-6, IL-11, Flt-3 Ligand, EPO, M-CSF, G-CSF	CB CD34 ⁺
da Silva et al., 2005	QBSF-60	-	SCF, bFGF, LIF, Flt-3 Ligand	BM MNC, CB MNC
De Bruyn et al., 2003	StemSpan H2000; Stem-alpha	-	SCF, IL-3, Flt-3 Ligand, G-CSF, TPO	CB CD34 ⁺
Douay et al., 1994	IMDM	-	SCF, Flt-3 Ligand, IL-3, IL-6, G-CSF, MGDF	BM CD34 ⁺
Ehring et al., 2003	StemSpan	-	-	CB AC133 ⁺

Tabelle 1.3: Übersicht zu *in vitro* Kulturen hämatopoetischer Stammzellen eingesetzten Wachstumsfaktoren

Referenz	Basalmedium	Serum	Wachstumsfaktoren	Zelltyp
Goncalves et al., 2006	QBSF-60	-	SCF, LIF, bFGF, Flt-3 Ligand	BM CD34 ⁺ , BM MNC
Goussetis et al., 2003	StemSpan	-	SCF, Flt-3 Ligand, TPO, IL-6	CB AC133 ⁺
Kawano et al., 2006	X-Vivo 10	-	SCF, TPO, Flt-3 Ligand	PB CD133 ⁺ , CB CD34 ⁺
Kobari et al., 1998	IMDM	-	SCF, IL-3, IL-6, EPO, G-CSF, MGDF	BM CD34 ⁺
Ladd et al., 1997	IMDM	k. A.	SCF, IL-3, IL-6	BM CD34 ⁺ HLA-DR ⁻ CD15 ⁻
Li et al., 2006	QBSF-60	-	SCF, TPO, Flt-3 Ligand, CTCE-0214 (SDF-1 Peptidanalagon)	CB CD34 ⁺
Mayani et al., 1993	IMDM	-	SCF, IL-3, IL-6, EPO, pIXY 321, M-CSF, G-CSF	CB CD34 ⁺ CD71 ⁺ CD45RA ^{low}
Mayani et al., 1995	IMDM	-	SCF, IL-3, IL-6, EPO, (Inhibitoren: MIP-1 α , TGF- β 2, TNF- α)	CB CD34 ⁺ CD71 ⁺ CD45RA ^{low} , CD34 ⁺ - Zellen aus fötaler Leber
McAlister et al., 1992	McCoys 5A	+	SCF, pIXY 321	PB MNC
Miller et al., 1998	IMDM	+	IL-3, MIP-1 α , stroma-derived soluble factors	BM CD34 ⁺
Suzuki et al., 2006	IMDM	-	SCF, TPO, Flt-3 Ligand, FP6 (IL-6/sIL-6R), IL-6, IL-3, Delta1-Fc chimäres Protein	CB CD34 ⁺ , CB CD133 ⁺
Tanaka et al., 2006	QBSF-60	-	SCF, TPO, IL-6 und sIL-6R	CB CD34 ⁺
Yang et al., 2007	QBSF-60	-	TPO, SCF, Flt-3 Ligand, (Serotonin)	CB CD34 ⁺
Yao et al., 2004	IMDM, RPMI 1640, McCoy's 5A, α -MEM, DMEM, BME, Fisher's Medium, Medium 199, F-12K, X-Vivo 20, Stemline, StemSpan H2000	-	TPO, IL-3, IL-6, IL-11, SCF, SCGF, G-CSF, GM-CSF, FL	CB MNC
Yeoh et al., 2006	StemSpan	-	SCF, IL-11, Flt-3 Ligand, FGF-1, FGF-2	BM C57BL/6 SJL DC45.1 (murin)
Yildirim et al., 2005	X-Vivo 20	-	SCF, Flt-3 Ligand, IL-6	CB CD34 ⁺
Zandstra et al., 1997	IMDM	-	SCF, IL-3, IL-6, Flt-3 Ligand	BM CD34 ⁺ CD38 ⁻ Annexin-V ⁻

Eine Reihe von Wachstumsfaktoren zeigen eine inhibierende Wirkung auf Proliferation und Differenzierung. Ihr Potential wird zurzeit bei der Erhaltung und Expansion von frühen Stammzellen gesehen, da eine schnelle Erschöpfung der Vorläuferzellen in Proliferations- und Differenzierungsprozessen unterbunden wird. Zu dieser Gruppe zählen TGF- β (Transforming Growth Factor-Beta), TNF- α (Tumor Necrosis Factor-Alpha) und MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha). *In vitro* Studien zeigten, dass der Einsatz von MIP-1 α eine bessere Erhaltung von LTC-IC gewährleistet (McAdams et al., 1996a). Eine völlig neue Gruppe von Wachstumsfaktoren wurde durch die Generierung von Fusionsproteinen eröffnet. Das erste Molekül dieser Art, das pIXY 321, ist eine Kombination der aktiven Regionen aus GM-CSF und IL-3 und zeigt eine erhöhte *in vitro* Aktivität im Vergleich zum Einsatz der einzelnen Proteine (Curtis et al., 1991).

1.4.4.2 Herstellung und Einsatz humaner Wachstumsfaktoren

Die Präsenz von Wachstumsfaktoren ist essenziell für den Ablauf von Differenzierungs- und Reifungsvorgängen im komplexen Schema der Hämatopoese. Durch die Einführung der gentechnischen Klonierungstechnologie wurden Anfang der 1980er Jahre rekombinante Proteine darunter auch Wachstumsfaktoren gewonnen aus Bakterien (Bertram und Gassen, 1991), Insektenzellen (Wang et al., 1995; Ding et al., 2003; Smith et al., 1985) und Säugerzellkulturen (Urlaub und Chasin, 1980; Kaufmann und Sharp, 1982) verfügbar. Bei der bakteriellen Expression liegen die rekombinanten Proteine oft unlöslich und deshalb inaktiv im Zytoplasma vor. Dies macht Rückfaltungen notwendig, um die Aktivität zu generieren. Mit eukaryotischen Systemen (z. B. CHO-Zellen) werden dagegen meist von vornherein bioaktive Proteine produziert. Die Aktivität ist abhängig von einer korrekten Faltung und posttranslationalen Modifikationen, wie Disulfidbrückenausbildung, Glykosylierung, Phosphorylierung oder Acylierung. Im Gegensatz zu bakteriellen Systemen besitzen eukaryotische Zellen das Potential diese Modifikationen am synthetisierten Protein vorzunehmen. Ein Nachteil jedoch ist die unzureichende Verfügbarkeit effizienter eukaryotischer Expressionssysteme, die es erlauben, Proteine in einem ökonomisch attraktiven Maßstab herzustellen. G-CSF, bereits 1986 von Nagata und Mitarbeitern kloniert und in *E. coli* exprimiert, wird bis heute *in vivo* in verschiedenen Varianten zur Mobilisierung von peripheren

Blutstammzellen eingesetzt (Nagata et al., 1986; Takeyama und Ohto, 2004). Humanes EPO wurde erstmals 1984 von zwei Gruppen unabhängig voneinander kloniert und exprimiert (Lin et al., 1985; Jacobs et al. 1985). Die Klonierung, Methoden der Expression in tierischen Zellkulturen, pharmazeutische Massenproduktion und Qualitätskontrolle von Wachstumsfaktoren für die klinische Anwendung wurde von Inoue und Mitarbeitern in einem Übersichtsartikel am Beispiel von humanem Erythropoetin ausführlich dargestellt (Inoue, et al., 1995). Der klassische, klinische Einsatz von EPO im Bereich des renalen Erythropoetindefizits wurde in einer Vielzahl von Übersichtsartikeln beschrieben (Graber und Krantz, 1989; Abels und Rudnick, 1991). Neue Einsatzfelder werden in den Bereichen der cerebralen Ischämie, des myokardialen Infarktes, der kongestiven Herzinsuffizienz und Neoangiogenese beschrieben (Maiese et al., 2005; Bahlmann et al., 2004). Humaner SCF wurde 1990 von Martin und Mitarbeitern kloniert, exprimiert und findet seinen Einsatz überwiegend in wissenschaftlichen Fragestellungen (Martin et al., 1990). SCF zeigt gerade in Kombination mit G-CSF eine synergistische Wirkung auf die Mobilisierung von Stammzellen. Die Wirkung ist jedoch aufgrund der stimulierenden Wirkung auf Mastzellen an die Gabe von Antihistaminika gebunden, was den klinischen Einsatz weitgehend verhindert.

1.4.4.3 Der Einsatz stromazellkonditionierter Medien

Vor der Entdeckung und Verfügbarkeit der rekombinanten Wachstumsfaktoren waren Kokulturen mit Knochenmarkstromazellen die einzige Möglichkeit zur Kultivierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Das erste System zur Expansion von murinen, hämatopoetischen Zellen auf einer konfluenten, monozellulären Schicht von Knochenmarkstromazellen wurde von Dexter und Mitarbeitern beschrieben (Dexter et al., 1977; Dexter et al., 1976a;b). Dieses Konzept wurde wenig später von Gartner und Kaplan auf das humane System übertragen (Gartner und Kaplan, 1980). Die einfachste Strategie sieht den Einsatz von konditionierten Zellkulturüberständen vor (Breems et al., 1997; Bhatia et al., 1997). Diese können in separaten Versuchsansätzen unter Verwendung von Stromazellen generiert werden. Obwohl versucht wurde die sekretierten, aktiven Moleküle mit Hilfe von chromatographischen Methoden zu identifizieren, bleibt zu vermuten, dass viele heute noch unbekannt sind (Gupta et al., 1996). Durch die

Verwendung von konditionierten Medien können die sezernierten Faktoren auch für Suspensionskulturen isolierter Stamm- und Vorläuferzellen genutzt werden. Diese können im Vorwege separat produziert, charakterisiert und unter geeigneten Bedingungen gelagert werden. Eine andere Variante stellt die Kokultur ohne direkten Zell-Zell-Kontakt in membrangetrennten Räumen dar, durch die der diffusionsgetriebene Austausch löslicher Komponenten gewährleistet ist (Verfaillie et al., 1994). Ein entscheidender Nachteil der Strategie des Einsatzes stromazellkonditionierter Medien ist das Fehlen von Zell-Zell-Kontakten zwischen den Stromazellen und den hämatopoetischen Zellen.

1.4.4.4 Zelluläre Systeme zur Kokultivierung

Für die Kokultur sind neben Zellen aus primären Quellen eine Reihe von Zelllinien verfügbar. Primäre Zellen, Knochenmarkfibroblasten, Osteoblasten, mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen und gemischte Populationen von Stromazellen wurden bislang aus unterschiedlichen Spezies gewonnen und ihre Fähigkeit zur Unterstützung der humanen Hämatopoese untersucht. Weiterhin wurde eine Reihe von immortalen Zelllinien generiert und teilweise mit Wachstumsfaktor-Genen transfiziert, um ihre Eigenschaften zu optimieren. Eine Übersicht von primären Zellen und permanenten Zelllinien befindet sich in der folgenden Tabelle 1.4. Interessanterweise zeigen murine Zelllinien eine bessere Leistung bei der Unterstützung, als die isolierten humanen Varianten. Die Eigenschaften derartiger Zelllinien können eine sehr spezifische Wirkung haben. So werden beispielsweise Differenzierungsvorgänge von Vorläuferzellen von den humanen Zelllinien L87/4 und L88/5 in Kokultur besser unterstützt als die Erhaltung der Vorläuferzellen (Bertolini et al., 1997). Das Haupthindernis für eine klinische Verwendung dieser überlegenen Zellkontakt-bietenden Systeme ist die Versorgung mit geeigneten Kokulturpartnern, z. B. Stromazellen. Obwohl autologe Zellen eine einfache Lösung darstellen, sind diese oft aufgrund einer Vorschädigung des Gewebes durch die myelotoxische Therapie nicht zu gewinnen. Die Verwendung von Zelllinien ist trotz der Proliferationsarretierung durch Bestrahlung oder Transfektion mit Suizidgenen fast unmöglich, da diese vor einer Transplantation vollständig entfernt werden müssten. Im Fall einer Verwendung von murinen Zelllinien ist dieses gleichbedeutend mit einer Xenotransplantation und daher arzneimittelrechtlich nahezu ausgeschlossen. Eine

Lösung für dieses Problem könnte ein Ansatz bieten, bei dem die Zelltypen auf den zwei Seiten einer porösen Membran kultiviert werden. Auf diese Weise ist ein Austausch löslicher Substanzen und der Aufbau von Zell-Zell-Kontakten gewährleistet und die Zellen vollständig kompartimentiert (Kawada et al., 1999).

Tabelle 1.4: Übersicht von Primärzellen bzw. Zelllinien zur zellkontaktfreien und zellkontaktbietenden Kultur von humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in Kokultivierungsansätzen

Primärzellart	Kultur mit Zellkontakt	Referenz
mikrovaskuläre Endothelzellen, Gehirn, Schwein	-	Davis et al., 1997a;b
mikrovaskuläre Knochenmarkendothelzellen, makrovaskuläre Umbilikalvenen-Endothelzellen, Stromazellen aus Knochenmark	-	Rafii et al., 1995
Human Brain Endothelial Cells (HUBEC)	-	Chute et al., 2006
γ -bestrahlte Stromazellen aus Knochenmark	-	Herman et al., 1998
Stromazellen aus Knochenmark	-	Castro-Malaspina et al., 1980
γ -bestrahlte Stromazellen aus Knochenmark	-	Bhatia et al., 1997
mikrovaskuläre Knochenmarkendothelzellen und makrovaskuläre Umbilikalvenen-Endothelzellen	- / +	Jazwiec et al., 1998
mikrovaskuläre Endothelzellen, Gehirn, Schwein	- / +	Rosler et al., 2000
Stromazellen aus Knochenmark, M2-10B4	- / +	Verfaillie und Catanzaro, 1996
γ -bestrahlte Stromazellen aus Knochenmark	- / +	Verfaillie, 1993
γ -bestrahlte Stromazellen aus Knochenmark	- / +	Yamaguchi et al., 2001
γ -bestrahlte Stromazellen aus Knochenmark	- / +	Schattner et al., 1998
mikrovaskuläre Knochenmarkendothelzellen und makrovaskuläre Umbilikalvenen-Endothelzellen, adenoviral transfiziert zur Produktion von SCF, Flt-3 Ligand, TPO, GM-CSF	+	Feugier et al., 2002
autologe HUVEC	+	Yildirim et al., 2005
Stromazellen aus Knochenmark	+	Sensebe et al., 1995
γ -bestrahlte Stromazellen aus Knochenmark	+	Koller et al., 1995a
γ -bestrahlte Stromazellen aus Knochenmark	+	Kawano et al., 2006
γ -bestrahlte Stromazellen aus Knochenmark, Stro-1 ⁺ -selektierte Stromazellpopulation	+	Goncalves et al., 2006
Stromazellen aus Knochenmark	+	Gartner und Kaplan, 1980
humane Osteoblasten	+	Ahmed et al., 1999
humane Osteoblasten, Stromazellen aus Knochenmark	+	Taichman et al., 1996

Tabelle 1.4: Übersicht von Primärzellen bzw. Zelllinien zur zellkontaktfreien und zellkontaktbietenden Kultur von humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in Kokultivierungsansätzen

Zelllinien	Kultur mit Zellkontakt	Referenz
BMEC-1, humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie aus Knochenmark	-	Candal et al., 1996
AFT024, murine fötale Leberzelllinie	-	Leung und Verfaillie, 2005
murine HS-5, transfiziert zur Produktion von Flt-3 Ligand	-	Goerner et al., 2000
murine MS-5	-	Kanai et al., 2000
murine M2-10B4, humane FHS-173-WE, murine NIH-3T3, Stromazellen aus Knochenmark	- / +	Burroughs et al., 1994
AFT024, murine fötale Leberzelllinie	- / +	Lewis und Verfaillie, 2000
murine FBMD-1	- / +	Kusadasi et al., 2001
murine AC6.21	- / +	Shih et al., 2000
murine HESS-5	(+)	Shimakura et al., 2000
primäre Endothelzelllinie, Gehirn, Yucatan-Meerschwein	+	Brandt et al., 1998
murine M2-10B4, NIH3T3	+	Podesta et al., 2001
transformierte Stro1 ⁺ -Stromazellen aus Knochenmark	+	Loeuillet et al., 2001
PU-34, transformierte Stromazellen aus Makaken-Knochenmark	+	Paul et al., 1991
S17, murine Stromazelllinie aus Knochenmark	+	Müller-Sieburg et al., 2002
murine S1/S1, murine M2-10B4 transfiziert zur Produktion von SCF, IL-3, G-CSF	+	Hogge et al., 1996
humane L87/4, L88/5	+	Breems et al., 1997 ; Thalmeier et al., 1994
murine Calvaria-Zellen	keine Kultur	Felix et al., 1988

Legende: „-“ kein direkter Kontakt zwischen Zellsystemen, so genannte membrangetrennte Transwell-Kokultur; „+“ direkter Kontakt mit dem anderen Zellsystem; „(+)“ Zell-Zell-Kontakt durch eine Zellbarriere hindurch.

1.4.5 Kulturführungsstrategien

1.4.5.1 Kultursysteme für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen

Die Nachstellung von charakteristischen Eigenschaften des *in vivo* Milieus wurde mit einer ganzen Reihe von Kultursystemen realisiert. Erst die Verfügbarkeit von rekombinanten Wachstumsfaktoren ermöglichte die Kultur isolierter Stamm- und

Vorläuferzellen ohne die Präsenz von Stromazellen. Diese Art der Kultivierung ist deutlich einfacher und es kann in chemisch definierten Kulturmedien ohne stromasezernierte Faktoren eine signifikante Expansion von Zellen erreicht werden (Alcorn und Holyoake, 1996). Dies ermöglicht einerseits eine gute Kontrolle der Kultur um den Einfluss von Einzelsubstanzen, z. B. Wachstumsfaktoren oder Hormone zu analysieren. Auf der anderen Seite muss man allerdings davon ausgehen, dass das Verständnis der Regulation der Hämatopoese noch keineswegs vollständig ist und dies zwangsläufig zu suboptimalen Kulturbedingungen führen muss (Jelinek, 2000). Die beschriebenen Systeme zur Kultur von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen lassen sich in vier Gruppen aufteilen: die statischen Kulturen, die Suspensionskulturen und die in zwei weitere Untergruppen unterteilten, offenen oder geschlossenen immobilisierten Systeme. Die statischen Kultursysteme stellen die einfachsten Systeme dar. Dazu zählen Multiwell-Platten, Zellkulturflaschen oder gaspermeable Kulturbeutel unterschiedlicher Größe und Ausführung (Brugger et al., 1993; Alcorn et al., 1996). Bis heute hat dabei nur die Kultur in gaspermeablen Beuteln eine klinische Relevanz erreicht. Diese Kultursysteme verbinden die Vorteile einer einfachen Handhabung, ihrer Verwendung als Einwegartikel und dem wegfallenden Problem des Nachweises einer suffizienten Reinigung sowie einer in der Regel einfachen Zellernte. Die Nachteile liegen in der fehlenden Möglichkeit zur Implementierung einer Bioprozessautomatisierung, z. B. einer kontinuierlichen Prozesskontrolle von Kulturparametern oder einer kontinuierlichen Fütterung der Zellen. Dies erzeugt inhomogene Kulturbedingungen hinsichtlich Parametern, wie z. B. Substratzufuhr, pH-Wert und Metabolitinhibierung (Soligo et al., 1998; Conrad et al., 1998).

Tabelle 1.5: Übersicht eingesetzter Kultursysteme mit Angabe des kultivierten Zelltyps

Kultursystem	Bioreaktor	Zellen	Referenz
Zellkulturschale	Multiwell-Platte (Corning-Costar, Acton, USA)	BM CD34 ⁺	Bagley et al., 1999
Zellkulturbeutel	Gaspermeable Teflonbeschichtete Beutel (American Fluoroseal)	PB MNC	Paquette et al., 2002
Zellkulturbeutel	Gaspermeable Teflon-Fluoropolymer-Beutel (American Fluoroseal, Columbia, MD)	BM CD34 ⁺ HLA-DR ⁻	Bhatia et al., 1997
Zellkulturschale, Kokultur	35 mm Kulturschale (Corning)	CB CD34 ⁻ Lin ⁻	Ando et al., 2000

Tabelle 1.5: Übersicht eingesetzter Kultursysteme mit Angabe des kultivierten Zelltyps

Kultursystem	Bioreaktor	Zellen	Referenz
Zellkulturschale mit membrangetrennten Räumen, Kokultur	24-Well-Platte (Iwaki Glass, Chiba, Japan), Membran Kultureinsatz (Polyethylenterephthalat track-etched, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ)	CB CD34 ⁺	Kawada et al., 1999
Gerührte Suspensionskultur	100 mL Bellco Spinner Modell 1967 mit Rührer 1965 und 25 mL Modell 1967-00025 (Bellco Biotechnology, Vineland, USA); Wheaton Modell 356673	PB MNC, CB MNC, PB CD34 ⁺	Collins et al., 1998b
Gerührte Suspensionskultur	250 mL Bellco Spinner	BM MNC	Sardonini et al., 1993
Gerührte Suspensionskultur	125 und 250 mL Corning Bioreaktor (Kat.-Nr.: 26502-125, 26502-250) mit „Paddle“-Rührer oder modifiziertem „4-blade Impeller“, 500 mL Wheaton Reaktor (Wheaton, Reaktorgefäß Kat.-Nr.: 356922, Impellerrührer Kat.-Nr.: 356902)	Murine neuronale Vorläuferzelllinie	Gilbertson et al., 2006
Gerührte Suspensionskultur	StemSpan Bioreaktor (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada)	CB CD34 ⁺	Kögler et al., 1998
Gerührte Suspensionskultur	400 mL Biostat Q (B. Braun, Melsungen), Bellco 1965-250 Rührer, d/D=0,8 (Bellco)	CB MNC, PB MNC	Collins et al., 1998a
Gerührte Suspensionskultur	250 mL Spinnerflasche	Human „Embryoid Bodies,“	Cameron et al., 2006
Gerührte Suspensionskultur	125 und 250 mL Spinnerflaschen (Corning Glass, Corning, NY) ; Thermolyne Cell-gro slow speed Magnetprüher, Drehzahl : 100 min ⁻¹ , (Thermolyne, Dubuque, IA)	Murine primäre neuronale Thalamuszellen	Kallos und Behie, 1999
Gerührte Suspensionskultur	2 Liter, Biostat MD (Sartorius BBI Systems, Melsungen, Deutschland)	Murine embryonale Stammzelllinie	Schroeder et al., 2005
Gerührte Suspensionskultur	Setric Genie (2 Liter, Setric Genie Industrial, Toulouse, Frankreich); 100 Bellco Spinnerflasche Modell 1965 (Bellco)	Primäre humane T-Zellen	Carswell und Papoutsakis, 2000
Gerührte Microcarrier-Suspensionskultur	Dextran Microbeads (Pharmacia Biotech, Piscataway, USA)	BM CD34 ⁺	Bagley et al., 1999
Gerührte Microcarrier-Suspensionskultur	100 mL Bellco Spinnerflasche Modell 1967-00100 (Bellco) ; Cultisphere G (Hyclone)	BM MNC	Zandstra et al., 1994
Microcarrier	Cultisphere GL (Hyclone, Logan, UT)	BM MNC	Sardonini et al., 1993
3D-Matrix	Cellfoam (Cytomatrix, Woburn, MA)	BM CD34 ⁺	Banu et al., 2001

Tabelle 1.5: Übersicht eingesetzter Kultursysteme mit Angabe des kultivierten Zelltyps

Kultursystem	Bioreaktor	Zellen	Referenz
3D-Matrix	Kalzium-basierte Keramikmatrix (Ultramet, Pacoima, CA)	BM CD34 ⁺	Bagley et al., 1999
3D-Matrix	TCPB (Tantalum-Coated Porous Biomaterial)	BM CD34 ⁺	Bagley et al., 1999
Geschlossenes Perfusionssystem	Aastrom Replicell Cell Production System (Aastrom Biosciences, Ann Arbor, MI, USA)	BM MNC	Lundell et al., 1999
Geschlossenes Perfusionssystem	Aastrom Replicell Cell Production System (Aastrom Biosciences, Ann Arbor, MI, USA)	CB MNC	Koller et al., 1998a
Geschlossenes Perfusionssystem	Aastrom Replicell Cell Production System (Aastrom Biosciences, Ann Arbor, MI, USA)	BM MNC, PB MNC	Engelhardt et al., 2001
Geschlossenes Perfusionssystem	kein Hersteller angegeben	BM MNC	Palsson et al., 1993 ;1995
Geschlossenes, perfundiertes, rotierendes Flachbettssystem	3D Culture Module (Hereaus, Osterode)	CB MNC	Köhler et al., 1999
Geschlossenes Perfusionssystem	kein Hersteller angegeben	BM MNC, CB MNC	Koller et al., 1993
Hollow-Fiber-System	Cell Pharm Modell BR110 (UniSyn Fibertec, San Diego, USA)	k. A.	Sardonini et al., 1993
Geschlossenes Perfusionssystem	Dialysemembran (25 Fibers Cuprophane D2, Membrana GmbH, Wuppertal); Oxygenierungsmembran 17 Fibers Oxyphane, Membrana)	Zelllinien: CCRF-CEM, HL-60, REH	Gloeckner und Lemke, 2001
Airlift-Reaktor	Cell Lift Airlift-Bioreaktor (Ventrex, Portland, USA)	BM MNC	Sardonini et al., 1993

Die gerührte Suspensionskultur, eine Standardtechnologie in der Zellkulturtechnik, bietet eine Reihe von Vorteilen, wie z. B. homogene Kulturbedingungen, die Möglichkeit der repräsentativen Probenahme von Zellen und Medium, eine umfangreiche Bioprozesskontrolle, einen effizienten Sauerstoffeintrag und eine schonende Ernte für den Einsatz von suspendierten Zellen. In der Literatur beschriebene Kulturgefäße sind Spinnerflaschenvarianten und der gerührte Bioreaktor (Schmidt, 2000; Collins et al., 1998a; Kim, 1998; Zandstra et al., 1994; Xiao et al., 1994; Smith et al., 1993; Pierson et al., 1996; McDowell und Papoutsakis, 1998a;b). Die Strategie der Immobilisierung dient dem Aufbau eines Mikromilieus aus dichten Zellverbänden, Matrixstrukturen und gelösten Faktoren, um die *in vivo*

Umgebung des Knochenmarks möglichst identisch nachzustellen. Diese Zellverbände können auch zusätzlich Stromazellen enthalten. Eine Reihe mikroporöser Trägersysteme, die teilweise mit Extrazellulärmatrix-Komponenten, wie z. B. Kollagen, Laminin, Fibronectin oder Metallen, wie z. B. Tantal, beschichtet wurden, sind dazu entwickelt wurden (Bagley et al., 1999). Dazu zählen sowohl Microcarrier, die auch in gerührten Bioreaktoren eingesetzt werden können, aber auch Hollow-Fiber-Module, Dialysemembranen und die Mikroenkapsulierung in z. B. Kollagenmatrices (Levee et al., 1994; Sardonini und Wu, 1993).

Tabelle 1.6: Eigenschaften von Kultursystemen

Kulturparameter	Kultursysteme			
	Statische Kulturen	Suspensionskulturen	Immobilisierende Systeme	
			Offene Systeme	Geschlossene Systeme
Inprozesskontrolle	-	+	(-)	(-)
Homogene Bedingungen	-	+	(-)	(-)
Zellmonitoring	(-)	+	-	-
Kokultivierung mit Stromazellen	(+)	(+)	+	+
Konditioniertes Mikromilieu	(-)	-	+	+
Kontinuierlicher Betrieb	-	+	+	+
Zellrückhaltung	+	+	(-)	+
Einfache Ernte	+	+	-	-
Klinisch relevante Produktion	+	+	+	+
Raum-Zeit-Ausbeute (3D-Kultur)	(-)	+	(+)	(+)
Beispiele	Zellkulturflasche, gasdurchlässiger Zellkulturbeutel	iCSTR	Microcarrier-Kultur im iCSTR oder Fließbettreaktor	Membranreaktor, Hollow-Fiber-Modul

Legende: +: besitzt Eigenschaft, (+): besitzt Eigenschaft nur eingeschränkt, (-): besitzt Eigenschaft unter bestimmten Voraussetzungen, -: besitzt Eigenschaft nicht.

Ein Nachteil der allen diesen Systemen gemein ist, besteht in der Problematik einer schonenden Ernte der Zellen nach der Kulturphase. Die heute am weitesten

entwickelte Technologie, das Replicell® System (Aastrom Biosciences Inc., Ann Arbor, MI, USA) ist ein automatisiertes System für die Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen und anderen Zelltypen zur klinischen Anwendung (Bachier et al., 1999; Chabannon et al., 1999; Jaroscak et al., 2003). Es besteht aus einer mit Rillen und Furchen besetzten Perfusionskammer für die Rückhaltung der Zellen. Der Medienstrom fließt dabei perpendicular zu den Rillen, was eine kontinuierliche Versorgung der Zellen mit frischen Nährstoffen und Entfernung von Stoffwechselmetaboliten ermöglicht (Sandstrom et al., 1996; Sandstrom et al., 1995; Koller et al., 1998a). Eine Literaturübersicht zu den bisher entwickelten Kultursystemen ist in Tabelle 1.5 zusammengefasst. Eine detaillierte Übersicht zu den wichtigsten Eigenschaften der verschiedenen Kultursysteme ist in Tabelle 1.6 zu finden.

1.4.6 Einsatz von Bioreaktoren

1.4.6.1 Primäranforderungen an Bioreaktoren

Die Primäraufgabe von Bioreaktoren besteht darin, die für den jeweiligen biologischen Prozess erforderlichen optimalen Umweltbedingungen aufrechterhalten (Schügerl, 1983). An die Gestaltung von Bioreaktoren ist nach Einsele eine Vielzahl von Anforderungen gestellt (siehe Tabelle 1.7).

Tabelle 1.7: Primäranforderungen an Bioreaktoren (nach Einsele et al., 1985, verändert)

-
- Großer volumetrischer Sauerstoff-Übergangskoeffizient $k_L a$
 - Homogene Verteilung aller Medienbestandteile
 - Vermeidung von schlecht durchmischten Zonen
 - Einhaltung von Temperatur-Grenzen (Temperieren)
 - Vermeidung von Zellaggregaten
 - Verwendete Materialien müssen biokompatibel sein (siehe Abschnitt 1.4.6.2)
 - Sterile Prozessführung
 - Zellen dürfen durch Scherkräfte nicht geschädigt werden
 - Einhaltung von pH-Wert-Grenzen
 - Versorgung der Zellen mit ausreichender Menge an essenziellen Substraten (Energiequelle)
 - Entfernung von Stoffwechselmetaboliten
-

1.4.6.2 Ziele des Einsatzes von Bioreaktoren

1. Große Raum-Zeit Ausbeute mit ausreichender Zahl an Stamm- und Vorläuferzellen

Zellen für die hämatopoetische Humantherapie sind patientenspezifisch hergestellt und müssen in suffizienter Quantität und Qualität zum Zeitpunkt der Applikation bereitgestellt werden. Im Fall des autologen Settings müssen die Zellen innerhalb eines Zeitraums von 1 bis 2 Wochen nach Gewinnung, entsprechend abgestimmt mit dem Zeitpunkt einer myeloablativen oder myelotoxischen Therapie zur Verfügung stehen.

2. Kontrollierte Kulturbedingungen (Temperatur, pO_2 , pH-Wert, Suspendierung, Fütterung)

Wie bereits beschrieben, haben die Kulturbedingungen einen signifikanten Einfluss auf Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Selbst geringe Veränderungen im pH-Wert oder der Mediumkomposition können die Proliferation oder Differenzierung beeinträchtigen. Diese Tatsache, zusammen mit dem geringen Startvolumen im frühen Stadium der Kultur, stellt eine Herausforderung an die Bioverfahrenstechnik dar. Ideal ist ein Kultursystem mit dem sowohl kleine Volumina und niedrige Zellkonzentrationen zu Beginn der Kultur als auch große Volumina und hohe Zelldichten am Ende zu kontrollieren sind. Dabei sind auch die zum Bau des Bioreaktors verwendeten Materialien und die z. B. durch Agitation entstehende mechanische Scherkräfte zu überprüfen und dem zu kultivierenden Zelltyp anzupassen.

3. Kontinuierliche Medienversorgung und Fütterungsstrategie

Wichtig für die Entwicklung effektiver Fütterungsstrategien sind kontinuierliche und repräsentative Informationen über den Zustand der Kultur. Aufgrund der sehr großen Unterschiede in der Qualität und Quantität des zellulären Materials, erscheint die Entwicklung von individuellen Kulturstrategien essenziell (Koller et al., 1996). Für die klinische Anwendbarkeit ist jedoch eine minimale Stammzelldosis eine Voraussetzung. Kenntnis über die exakte Zusammensetzung des Ausgangsmaterials könnte entscheidende Informationen für die Auswahl der Kulturstrategie liefern. Zusätzlich dazu könnte, basierend auf der Analyse der Kulturparameter, die zelluläre Komposition der Kultur adaptiv kontrolliert werden. So basiert der Energiestoffwechsel reiferer Zellen schwerpunktmäßig auf der oxidativen Phosphorylierung, wobei Vorläuferzellen die Energie über Substratstufen-

Phosphorylierung gewinnen (Collins et al., 1997). Die zeitnahen Kenntnisse über Nährstoffaufnahmearten und das -angebot, sowie der Anfall und die Produktionsraten von Metaboliten, sind somit nicht nur die Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer Fütterungsstrategie, sondern können auch als Basis für eine Analyse der Zusammensetzung der Kultur dienen.

4. Einfache, effektive und schonende Zellernte

In diesem biotechnologischen Verfahren sind die Zellen das Produkt und die Zellernte sollte vollständig und schonend durchzuführen sein, da diese einen direkten Einfluss auf die Qualität des Transplantates haben. Ziel sollte hier sein, Anzahl und Komplexität der Verfahrensschritte zur Zellgewinnung (z. B. Trypsinierung, Zentrifugation) zu minimieren, da diese sowohl die Gefahr eines Zellverlustes als auch einer Kontamination in sich bergen.

5. Klinische Anwendbarkeit des zellulären Produktes

Die gesetzlichen Vorgaben zur Zelltherapie sind auf das zelluläre Material und alle dem Prozess zugeführten Materialien anzuwenden. Die Verwendung von Zelllinien, speziell tierischen Ursprungs, für die Kokultivierung mit Stromazellen, oder der Einsatz von tierischem Serum ist genau zu überdenken, da unüberwindbare regulatorische Hürden entstehen können.

1.4.6.3 Biokompatibilität von Zellkulturmaterialien

Wie bereits ausführlich beschrieben, ist das Schicksal von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflussbar. Folglich ist auch die Biokompatibilität von Zellkulturmaterialien eine wichtige Fragestellung. Es ist sicherzustellen, dass alle produktberührenden Materialien weder Toxine (z. B. Kunststoffmonomere oder Weichmacher) freisetzen, noch Medieninhaltsstoffe quantitativ, durch z. B. Adhäsion von Proteinen, aus dem Medium entfernen. Im Fall der Immobilisierung von Zellen ist insbesondere auf die Oberfläche, z. B. Ladung, zu achten. Eine sehr umfangreiche Übersicht über eine Vielzahl von Kulturmaterialien wurde von Laluppa und Mitarbeitern veröffentlicht (Laluppa et al., 1997). In einem Vergleich zu dem klassischen Kulturmaterial für Kulturflaschen oder –Schalen, dem Polystyrol, wurden deren Auswirkungen auf verschiedenen Zelltypen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die CFU-Expansion als deutlich sensiblerer Parameter als die Expansion der CD34-positiven oder der gesamten mononukleären Zellen

anzusehen ist. Als wichtiges Ergebnis dieser Studien ist die protektive Wirkung von Serum zu bewerten. Als Grund dafür wird die Absättigung von Oberflächen mit Serumproteinen vermutet, so dass keine weiteren essenziellen Proteine gebunden werden können. Ein Hinweis auf eine direkte Interaktion mit der Oberfläche lieferten Experimente, die eine direkte Korrelation zwischen der Größe der interagierenden, inkompatiblen Materialoberfläche und dem Grad der Inhibierung ergaben (Noll et al., 2002). Das Verhältnis aus berührender Materialoberfläche und Kulturvolumen sollte gerade bei der Entwicklung neuer Bioreaktorsysteme berücksichtigt werden. Da eine direkte Vorhersage der Inkompatibilität von Zellkulturmaterialien aufgrund geringster Verunreinigungen nicht vorhersagbar ist, müssen neue Systeme sehr sorgfältig auf ihre Eignung hin überprüft werden. Da das System der Hämatopoese sehr komplex ist und aus einer Vielzahl von sehr unterschiedlichen Zellen besteht, sollte die Kompatibilität auf möglichst vielen Ebenen nachgewiesen werden, um eine sichere Aussage treffen zu können. Die gilt insbesondere für Bioreaktorsysteme, die oft aus mehreren Materialkomponenten, wie z. B. Glasreaktor-Gefäß, edelstahlummantelter- pO_2 -Elektrode, Silikondichtungen, PEEK-Deckel und –Gehäuse, aufgebaut sind.

1.5 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit

1.5.1 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Die Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen stellt ein wichtiges interdisziplinäres Forschungsgebiet an der Grenze zwischen der klassischen Transfusionsmedizin und der modernen Biotechnologie dar. Die Quellen hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen sind stark limitiert. Die Gründe dafür liegen in der Verfügbarkeit geeigneter Spender, der Gefahr viraler Kontaminationen und der Erschöpfung autologen Zellmaterials im Fall von Chemo- und/oder Strahlentherapie oder der Präsenz von malignem Zellmaterial. Ein *ex vivo* Kultursystem zur Amplifizierung hämatopoetischer Progenitorzellen könnte die Anzahl der in Frage kommenden autologen Transplantationen vergrößern, die Nutzung von Nabelschnurblut zur Rekonstitution von adulten Patienten ermöglichen und die notwendigen Ausgangsmengen für eine Transplantation von Stamm- und Progenitorzellen aus Knochenmark oder mobilisiert aus peripherem Blut verringern.

Das primäre Interesse dieser Arbeit galt der Expansion von isolierten adulten hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus peripherem Blut zur Unterstützung oder zum Ersatz der traditionell für die Rekonstruktion der Hämatopoese der Patienten in den hämatologischen und onkologischen Kliniken eingesetzten Transplantate.

Die Ziele der Arbeit lassen sich unter der Überschrift einer „Integrierten Prozessentwicklung zur Vermehrung von adulten hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen“ zusammenfassen. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich in den folgenden Punkten:

1. Beantwortung offener Fragen im Bereich der Auswahl eines geeigneten Kulturmediums. Dies umfasste den als kritisch einzuschätzenden Einsatz von Serum und dessen Substitution durch geeignete Proteinzusätze. Des Weiteren die Auswahl und die Zugabe von Wachstumsfaktoren zur gezielten Steuerung von Proliferations- und Differenzierungsprozessen, aber auch zur Maximierung der Expansion durch Verhinderung von apoptotischen Prozessen. In diesem Zusammenhang sollten aus Kostengründen einige Wachstumsfaktoren auf der Basis rekombinanter Baculoviren in Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt werden. Diese sollten vergleichend zu kommerziellen Proteinen aus *E. coli* analysiert werden.
2. Untersuchung des Potentials von Zell-Zell-kontaktfreien Kokultivierungsstrategien als Alternative zum Einsatz von rekombinanten Wachstumsfaktoren. Dazu sollten verschiedene primäre Zelltypen und kontinuierliche Zelllinien für die Konditionierung von Zellkulturüberständen zum Einsatz kommen. Bestimmt wurde die Auswahl dieser Zellsysteme durch Ihre Sozialisierung mit den Stamm- und Vorläuferzellen im Mikromilieu des Knochenmarks.
3. Entwicklung eines miniaturisierten, voll-kontrollierten Bioreaktorsystems zur submersen Kultivierung und Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Zunächst sollte die prinzipielle Eignung des Systems an geeigneten Modellzelllinien demonstriert werden. Im Weiteren sollten kritische Betriebsparameter für die Kultur von primären Zellen optimiert werden. In anschließenden Untersuchungen sollte daraufhin der Einfluss einer kontinuierlichen Perfusion auf Stamm- und Vorläuferzellen analysiert werden.

1.5.2 Struktur der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde Ende des Jahres 1998 konzipiert und die praktischen Arbeiten wurden zwischen Januar 1999 und September 2002 durchgeführt. Für die Darstellung der Arbeitsabschnitte der vorliegenden Arbeit wurde zur Visualisierung ein Flussdiagramm eingefügt (siehe Abbildung 1.5). Es ist zu erkennen, dass die Arbeit neben dem klassischen Aufbau experimentell in drei experimentelle Bereiche unterteilt wurde: 1. Ermittlung von allgemeinen Kulturparametern, 2. Herstellung essenzieller, humaner hämatopoetischer Wachstumsfaktoren und 3. Etablierung, Charakterisierung und Einsatz eines neuartigen, miniaturisierten Bioreaktorsystems zur Kultivierung von Stamm- und Vorläuferzellen.

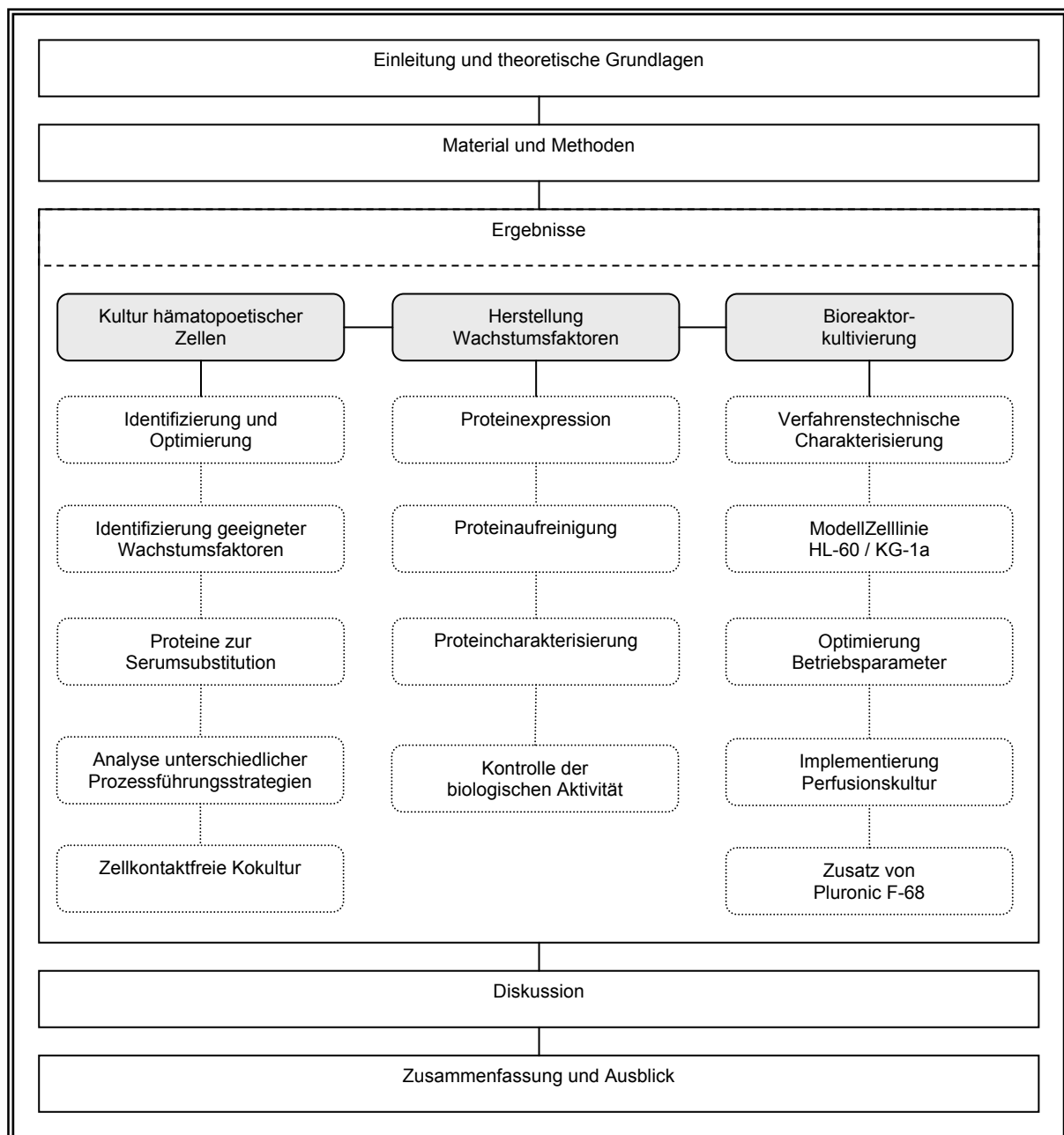


Abbildung 1.5: Flussdiagramm zur Verdeutlichung der Arbeitsabschnitte der vorliegenden Arbeit.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien und Viren

2.1.1 KG-1a

Die KG-1a-Zelllinie ist ein Subklon der humanen akuten myeloischen Leukämie-Zelllinie KG-1 und wurde aus Knochenmarkaspirat eines 59-jährigen kaukasischen Mannes gewonnen und etabliert (Koeffler und Golde, 1980). Sie ist von einer frühen myeloiden Vorläuferzelle abgeleitet und trägt neben den myeloiden Oberflächenantigenen CD13, CD15 auch das CD45, das so genannte Pan-Leukozytenantigen, sowie das CD34 Antigen. Die Zelllinie wächst in Suspension, neigt nicht zur Adhärenz oder Aggregatbildung und ist die einzige verfügbare CD34⁺-Zelllinie, die ohne Wachstumsfaktorgabe wächst. Diese Eigenschaften hat sie zu einer idealen Modellzelllinie für die Kultur von primären CD34⁺-Zellen gemacht, gerade auch im Hinblick auf verfahrenstechnische Fragestellungen (Schmidt, 2000). Die Zellen wurden in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute-Medium 1640, Sigma, St. Louis, MO, USA) mit 10% fötalem Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS) kultiviert. Die verwendete KG-1a wurde über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Zelllinie Nr.: ACC 421) beschafft. Die KG-1a-Zelllinie wurde als Modell-Zelllinie zur Bioreaktorkultivierung und als Positivkontrolle bei der durchflußzytometrischen Analyse von CD34⁺-Zellen eingesetzt (s. Abschnitt 2.7.1).

2.1.2 HL-60

Die HL-60-Zelllinie wurde von Collins aus der Leukapherese einer 35-jährigen kaukasischen Frau mit akuter promyeloischer Leukämie (AML FAB M2) isoliert (Collins et al., 1977). Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS kultiviert. HL-60 wurde über die DSMZ (Zelllinie Nr.: ACC 3) beschafft. Die HL-60-Zelllinie wurde als Modell-Zelllinie zur Bioreaktorkultivierung eingesetzt.

2.1.3 M2-10B4

Die murine, fibroblastenartige Zelllinie M2-10B4 wurde 1988 aus den stromalen Knochenmarkzellen einer C57BL/6J x C3H/HeJ/F1 Maus gewonnen (Lemoine et al., 1988). Die Zelllinie unterstützt die Langzeit-Kultur von humanen primären Stamm- und Progenitorzellen in gleichem Maße wie bestrahltes primäres humanes Stroma (Hogge et al., 1996). Die Zellen wurden in ZKT-1-Medium (Biochrom KG, Berlin) mit $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Glutamin und 10% FCS kultiviert. Die M2-10B4 wurde über die American Type Culture Collection (ATCC) (Zelllinie Nr.: CRL-1972) durch die Medizinische Hochschule Hannover beschafft. M2-10B4-Zelllinie wurde zur Konditionierung von Zellkulturüberständen und für den CAFC-Assay benutzt.

2.1.4 SAOS-2

Die Zelllinie SAOS-2 wurde 1973 aus dem primären Osteosarkom eines 11-jährigen Mädchens isoliert (Fogh et al., 1977). Die Zelllinie hat eine epithelzellartige Morphologie und wächst adhärent in strikten Monolayern. Die Zellen wurden in ZKT-1-Medium mit $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Glutamin und 10% FCS kultiviert. SAOS-2 wurde über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Zelllinie Nr.: ACC 243) beschafft. Die SAOS-2-Zelllinie wurde zur Konditionierung von Zellkulturüberständen benutzt.

2.1.5 C3H10T1/2

Die murine, embryonale C3H10T1/2-Zelllinie wurde 1972 aus dem Embryo einer C3H Maus gewonnen (Reznikoff et al., 1973). Die fibroblastenartige Zelllinie wächst adhärent und zeigt Kontaktinhibierung. Die Zellen wurden in ZKT-1-Medium mit $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Glutamin und 10% FCS kultiviert. C3H10T1/2 wurde über die American Type Culture Collection (ATCC) (Zelllinie Nr.: CCL-226) beschafft. Die C3H10T1/2-Zelllinie wurde zur Konditionierung von Zellkulturüberständen benutzt.

2.1.6 5637

Die Zelllinie 5637 wurde 1977 aus dem primären Blasenkarzinom eines 68-jährigen Mannes isoliert (Fogh et al., 1977). Die 5637 produziert und sekretiert eine Vielzahl von aktiven Wachstumsfaktoren, z. B. G-CSF, SCF, GM-CSF. Sie stimuliert damit die Proliferation einer Reihe von Wachstumsfaktor-abhängigen Leukämiezelllinien wie z. B. MUTZ-2, M-07e, TF-1 oder OCI-AML5. 5637-konditioniertes Medium findet aus diesem Grund häufigen Einsatz bei der Stammhaltung von wachstumsfaktor-abhängigen Leukämiezelllinien für Mitogenassays (Quentmeier et al., 1997). Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 2 mmol·L⁻¹ L-Glutamin und 10% FCS kultiviert. 5637 wurde über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Zelllinie Nr.: ACC 35) beschafft. Die 5637-Zelllinie wurde zur Konditionierung von Zellkulturüberständen benutzt.

2.1.7 M-07e

Die humane M-07e Zelllinie wurde 1987 aus dem peripheren Blut eines sechs Monate alten Mädchens mit akuter megakaryoblastischer Leukämie (AML M7) etabliert. Die Zellen wachsen in Suspension, zeigen jedoch eine leichte Adhärenz. Die Zellen zeigen eine ausgeprägte Abhängigkeit gegenüber der mitogenen Aktivität einer Reihe von Wachstumsfaktoren (z. B. GM-CSF, Interleukin-3 (IL-3), IL-4, SCF, TPO (Thrombopoetin)) und wird in der Praxis auch für ihren qualitativen und quantitativen Nachweis eingesetzt. Die Stammhaltung der M-07e wurde in RPMI 1640 mit 10% FCS und 20% 5637-konditioniertem Medium durchgeführt. M-07e wurde über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Zelllinie Nr.: ACC 104) bezogen. Die M-07e Zelllinie wurde zur Analyse der biologischen Aktivität von rekombinanten, humanen Wachstumsfaktoren eingesetzt.

2.1.8 Sf9

Bei der Zelllinie Sf9 handelt es sich um einen Klon der Zelllinie IPLB Sf21 AE, die 1977 von Vaughn und Mitarbeitern aus den Ovarien der Lepidopterenart *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) etabliert wurde (Vaughn et al., 1977). Sie wurde von Smith et al. 1985 als Wirtszelle für Baculoviren kloniert. Sf9 wurde über die

American Type Culture Collection (ATCC) (Zelllinie Nr.: CRL-1711) bezogen. Die Zelllinie wurde im Rahmen der Produktion von humanen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren eingesetzt.

2.1.9 BTI Tn5B1-4 (High Five®)

Die Zelllinie BTI Tn5B1-4 (High Five®) wurde von Granados aus den Ovarien aus *Trichoplusia ni* isoliert und unter anderem von Davis und Mitarbeitern detailliert im Hinblick auf die Expression rekombinanter Proteine untersucht (Davis et al., 1993). Die Zelllinie wurde von der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) bezogen und wurde im Rahmen der Produktion von humanen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren eingesetzt.

2.1.10 Rekombinante Baculoviren

Die beiden rekombinanten Viren AcMNPV-hIL3 (Ding et al., 2002) und AcMNPV-hSCF wurden von Dr. Hongbiao Ding (Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China) im Rahmen eines DAAD-Stipendiums in Kooperation mit der Arbeitsgruppe (AG) Dr. H.A. Weich und der AG Zellkulturtechnik der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die rekombinanten Viren wurden im Rahmen der Produktion der entsprechenden humanen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (IL-3, SCF) eingesetzt.

2.2 Quellen und Gewinnung von Primärzellen

2.2.1 CD34⁺-Zellen

Die Präparate bereits aufgereinigter CD34⁺-Zellen wurden der GBF im Rahmen einer Kooperation mit der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), Hannover, mit positivem Votum der Ethikkommission der MHH für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Die Spender aller übergebenen und verwendeten Präparate

haben ihre Einwilligung zu Verwendung der Zellen zu wissenschaftlichen Zwecken bereits bei der Gewinnung der Zellen schriftlich gegeben. Die Zellen wurden aus gesunden mittels G-CSF-Mobilisierung und Leukapherese (Cobe SPECTRA, Gambro BCT, Lakewood, CO, USA) gewonnen. Die CD34⁺-Zellen wurden anschließend mit Hilfe der CliniMACS[®]-Technologie (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) in Kombination mit einem CliniMACS CD34⁺ Complete Kit[®] (Miltenyi Biotec) aufgereinigt und $4 \cdot 10^7$ CD34⁺-Zellen mit einer Reinheit von > 90% in 20 mL autologem Plasma mit 10% DMSO im 50ml-Beutel (Cryocyte 50, Baxter) kryokonserviert.

2.2.2 Aufreinigung CD34-positiver Zellen

Die kryokonservierten Leukapheresepräparate wurden der GBF im Rahmen einer Kooperation mit der MHH zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden aus gesunden Spendern mittels G-CSF-Mobilisierung und Leukapherese (Cobe SPECTRA[®], Gambro BCT) gewonnen. Die Präparate enthielten zwischen 2 und $6 \cdot 10^9$ mononukleären Zellen mit einem Anteil CD34⁺-Zellen von 0,8 bis 2% in 100 mL autologem Plasma mit 10% DMSO. Die Isolation humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen wurde mit Hilfe der positiven Selektion CD34-exprimierender Zellen, basierend auf der Magnetischen Hochgradienten-Separationsmethode (MACS), durchgeführt. Die Technik basiert auf der immunologischen Interaktion von Zellantigenen mit an kolloidalen, magnetischen Nanopartikeln gebundenen spezifischen Antikörpern. Die auf ihrer Oberfläche „magnetisierten“ Zellen werden in einer ferromagnetischen Säulenmatrix, die in einem Magnetfeld platziert wird, zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die gepackte Säule ungehindert passieren können. Durch Entfernen der Säule aus der stark-magnetischen Halterung verlieren die Nanopartikel ihre Magnetisierung und die Zellen können aus der Säule gespült werden (Miltenyi et al., 1990).

Zur Isolierung der CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen wurde das „Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit[®]“ (Miltenyi Biotec) eingesetzt, das auf dem Prinzip der direkten Markierung basiert. Das Kit verwendet den Klon QBEND/10, einen monoklonalen CD34-Antikörper, der das CD34-Epitop Klasse II erkennt. Die Zellisolierung wurde mit Hilfe eines Vario-MACS[®] Separator (Miltenyi Biotec) nach

den Angaben des Herstellers durchgeführt. Ausnahmen waren die zwei im Folgenden beschriebenen notwendigen Modifikationen bei der Zellvorbereitung.

Modifikation 1: Da fast ausschließlich kryokonservierte, unseparierte Leukapheresen zur Verfügung standen, war vor der entsprechenden Markierung der Zellen eine zusätzliche Behandlung notwendig. Aufgrund eines durchgängig hohen Granulozytenanteils (30 – 70%) der Leukapheresate und der vermehrten Lyse dieser Zellen nach dem Auftauvorgang kam es durch die Freisetzung großer Mengen doppelsträngiger DNA zu einer erheblichen Aggregatbildung und aufgrund dessen zu einer Reduktion der Ausbeute isolierter CD34⁺-Zellen. Um der Aggregatbildung, unterstützt durch bivalente Ionen, entgegen zu wirken, wurden die Zellen ausschließlich in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ mit 0,6% Zitronensäure-Natriumzitat-Dextrose-Adenin-Lösung (ACD-A: 22,3 g·L⁻¹ Glukose; 22 g·L⁻¹ Natriumzitat; 8 g·L⁻¹ Zitronensäure; 0,275 g·L⁻¹ Adenin) gelagert und gewaschen. Darüber hinaus wurde eine Inkubation der aufgetauten Zellen mit rekombinanter DNase (Pulmozyme, Roche, Mannheim) mit einer Konzentration von 200 Einheiten/mL bei 37° C in Ca²⁺-haltigem Iscove's Modification of Dulbecco's-Medium (IMDM, Sigma, St. Louis) bis zur vollständigen Lyse der Zellaggregate durchgeführt. Anschließend wurden die Zellaggregate mit einer 25 mL-Stabpipette nahezu vollständig aufgelöst, um die Gefahr einer Verblockung der Säulenmatrix zu minimieren. Die Einzelzellsuspension wurde mit Hilfe eines Zell-Filtrationsschrittes hergestellt. Verbliebene Zellaggregate wurden dazu mit einem 70 µm Filter (Falcon, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA) abgetrennt und die Einzelzellsuspension der magnetischen Markierung unterzogen.

Modifikation 2: Zur Verbesserung der Reinheit wurde eine Zwei-Säulen-Strategie verfolgt. Im ersten Schritt wurde, entsprechend der größeren Zellmengen, eine VS⁺-Säule, eine Positivselektionssäule mit einer Kapazität von 1·10⁸ positiv-markierten Zellen bzw. 2·10⁹ Gesamtzellen eingesetzt. Im zweiten Schritt konnte aufgrund der ausschließlichen Verwendung der ersten Positivfraktion der VS⁺-Säule eine kleinere RS⁺-Säule (beide Miltenyi Biotec) eingesetzt werden, die eine Kapazität von 1·10⁷ positiv-markierten Zellen hat.

2.2.3 Isolierung primärer Stromazellen aus humanem Knochenmark

Kryokonservierte Aliquote ($4 \cdot 10^7$ Zellen pro Röhrchen) unseparierten Knochenmarks wurden der GBF im Rahmen einer Kooperation mit der MHH für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt.

Ziel dieser Isolierung war es, die adhärente, morphologisch fibroblastenähnliche Zellpopulation aus dem Knochenmark zu etablieren. Kryokonservierte Aliquote von unsepariertem Knochenmark (10^7 Zellen) wurden aufgetaut und einer Erythrozytenlyse (s. Abschnitt 2.4.4) unterzogen. Die Zellen wurden anschließend dreimal in IMDM-SMOD (IMDM-Stroma Modified) gewaschen und in 20 mL IMDM-SMOD (Zusammensetzung s. Tabelle 2.1) in einer 75 cm^2 Zellkulturflasche ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde ein erster Mediumwechsel durchgeführt, um nicht- und leicht adhärente Zellen zu entfernen. Die adhärente Fraktion wurde bis zu 80%iger Konfluenz kultiviert und dann passagiert. Für eine Expansion der stromalen Zellen wurden ein Drittel der Zellen abermals ausplattiert und bis zu 80% Konfluenz kultiviert, passagiert und für eine spätere Verwendung kryokonserviert. Die kryokonservierten primären, humanen, stromalen Knochenmarkszellen wiesen zum Zeitpunkt ihrer Verwendung eine durchschnittliche Passagenzahl von 3 auf.

Tabelle 2.1: Formulierung IMDM-SMOD

Medienbezeichnung	Bestandteile
IMDM-SMOD	Iscove's Modification of Dulbecco's Medium (IMDM)-Flüssigmedium (Sigma, St. Louis) 10% Humaner Serumpool Blutgruppe AB (Institut für Transfusionsmedizin der MHH) 10% FCS (Biochrom KG, Berlin) $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hydrocortison (Sigma, St. Louis)

2.2.4 Isolierung primärer HUVEC

Von der Frauenklinik des Städtischen Klinikums Braunschweig, Klinikum Celler-Strasse, Chefarzt Prof. Dr. Grospietsch, wurden nach positivem Votum durch die

zuständige Ethik-Kommission bei der Ärztekammer Niedersachsen Nabelschnüre bzw. Nabelschnurteile der GBF für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung gestellt. Die Nabelschnüre bzw. Nabelschnurteile wurden nach normaler, spontaner Geburt eines gesunden Kindes mit der Zustimmung der Mutter durch das Klinikpersonal gewonnen und für maximal 48 Stunden bei 4° C in einem 50 mL Röhrchen (Falcon) gelagert. Die Nabelschnüre wurden sofort nach dem Transport in die GBF in einer Sterilwerkbank verarbeitet. Die Nabelschnüre wurden mit sterilem Cord-Puffer von außen gespült und anschließend mit einem sterilisierten Tuch trockengetupft. Die Nabelschnüre wurden auf beiden Seiten um 1 cm gekürzt um die Druckstellen der Venenklemmen zu entfernen. In beide Enden der Nabelschnurvene wurden Knopfkanülen (Luer Lock, Spritzenolive C, Acufirm, Dreieich) eingeführt und mit chirurgischem Faden (Dafilon, B. Braun, Melsungen) ligiert um ein Herausrutschen der Kanülen während der Inkubation zu verhindern. Mittels einer Spritze (B. Braun) wurde in beide Richtungen der Vene 30 mL Cord-Puffer durch die Vene gedrückt um verbliebenes, teilweise bereits geronnenes Blut herauszuspülen. Mit einer 5 mL Spritze (B. Braun, Melsungen) wurde die Pronase-Lösung eingefüllt und die gesamte Vene prall gefüllt (ca. 1 mL pro cm Vene). Die Nabelschnüre wurden anschließend mit den Enden oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche eines sterilen Becherglases mit Ringerlösung (37° C) platziert, aseptisch abgedeckt und für 30 min in einem Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Nabelschnüre trockengetupft und mit einer atraumatischen Pinzette massiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen mit 20 mL Cord-Puffer in ein 50 mL Röhrchen gespült. Die Zellsuspension wurde 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 200 g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit HUVEC Wachstumsmedium (EGM-2 Bullet Kit, Clonetics, Cambrex Bio Sciences, Verviers) resuspendiert und die Zellen in einer 25-cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Nach 24 Stunden wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt, um nicht-adhärenente Zellen, wie z. B. Erythrozyten zu entfernen. Adhärenente HUVEC wurden bis zu einer 80%igen Konfluenz kultiviert und dann passagiert. Für eine Expansion der HUVEC wurde zur Passagierung ein Drittel der Zellen abermals bis zu einer 80%igen Konfluenz kultiviert, passagiert und für eine spätere Verwendung kryokonserviert (siehe Abschnitt 2.4.2 Kryokonservierung). Der zur Medienkonditionierung eingesetzter Pool kryokonservierter primärer HUVEC bestand aus 10 Isolationen. Jede einzelne Fraktion wies eine durchschnittliche

Passagenzahl von 3 auf. Die Zusammensetzung aller für die Isolation der HUVEC benötigten Medien und Lösungen ist in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Formulierungen der Medien und Lösungen zur Isolation und Kultur von HUVEC

Medien-/Puffer-bezeichnung	Bestandteile
Cord-Puffer:	8,0 g·L ⁻¹ NaCl, 0,2 g·L ⁻¹ KCl, 1,15 g·L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , 1,8 g·L ⁻¹ α-D-Glukose (alle Komponenten Sigma)
Pronase-Lösung:	2 g Pronase (Sigma) in 800 mL 0,5 x Cord-Puffer lösen, über Nacht dialysieren (Spectra/Por, 3.500 MWCO (Molecular Weight Cut Off), Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, US), aliquotieren und bei -20° C lagern
Ringerlösung:	6,0 g·L ⁻¹ NaCl, 0,2 g·L ⁻¹ KCl, 2,0 g·L ⁻¹ CaCl ₂
HUVEC-Wachstumsmedium	EGM-2 Bullet Kit inkl. Wachstumsfaktoren

2.3 *Medien und Supplemente*

2.3.1 Fötales Kälberserum

Nach dem Auftauen wurde das fötale Kälberserum (FCS) (Seromed, Biochrom KG, Berlin) zur Inaktivierung zytotoxischer und zytolytischer Proteine, wie z. B. Komplement-Proteinen eine Stunde im Wasserbad (Köttermann, Typ 3043, Uetze-Hänigsen) bei 56° C inkubiert. Das auf diese Weise inaktivierte Serum wurde bis zur Verwendung für maximal einen Monat bei 4° C gelagert.

2.3.2 Humanes AB-Serum

10 Serumkonserven humanen Serums Blutgruppe AB (Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung für Transfusionsmedizin, Hannover) wurden nach dem Rhesus-Faktor (Rh-Faktor) getrennt gepoolt (Pool_{Rh+} = 1288 mL, Pool_{Rh-} = 898 mL). Vor der Inaktivierung wurde das Temperaturprofil eines Vergleichsgefäßes mit identischem Volumen Wasser aufgenommen, um die Haltezeit festzustellen. Die Inaktivierung des Serums wurde 1 Stunde im Wasserbad (Köttermann) bei 56° C durchgeführt. Danach erfolgte eine separate Aliquotierung der beiden Serumpools auf 50 mL

Röhrchen (Becton-Dickinson) und Lagerung bei -20°C . Referenzröhrchen beider Pools wurden vor der Verwendung auf Sterilität überprüft. Bei Bedarf wurde eine entsprechende Anzahl an Röhrchen aufgetaut, 10 min bei 600 g zentrifugiert, und der von den Kryoaggregaten getrennte Überstand bis zur Verwendung für maximal einen Monat bei 4°C gelagert.

2.3.3 Basalmedien für die Kultur primärer Blutzellen

Da das Kulturmedium sowie die Supplemente Gegenstand der Untersuchungen waren, ist die für den jeweiligen Versuchsansatz verwendete Medienzusammensetzung im entsprechenden Abschnitt im Abschnitt 3 Ergebnisse angegeben. Tabelle 2.3 enthält alle für die Kultur von Primärzellen und Zelllinien eingesetzten Flüssigmedien und -Komponenten.

Tabelle 2.3: Übersicht eingesetzter Zellkulturmedien und -zusätze

Medium/ Komponente	Hersteller	Informationen zu Inhaltsstoffen	Applikation(en)
CellGro SCGM	Roche Diagnostics, Mannheim	Serumfrei, humane oder rekombinante humane Proteine	Kultur hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen
AIM V	Gibco BRL, Paisley, Schottland	Zellkulturmedium	
StemSpan SFEM	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada	Bovines Albumin, Insulin, humanes Transferrin, ME, L-Gln, IMDM	
X-Vivo 15	BioWhittaker, Cambrex Bio Sciences, Verviers	Humanes Albumin, rek. Insulin, pasteurisiertes hum. Transferrin	
Stempro-34	Gibco, Paisley	Serumfrei, humane oder rekombinante humane Proteine	
IMDM	Sigma, St. Louis, MO, USA	Zellkulturmedium	Zellwaschen
RPMI 1640	Sigma	Zellkulturmedium	Kultur humaner Zelllinien (HL-60, KG-1a)
ZKT-1	s. Abschnitt 2.3.6		
IMDM-SMOD	eigene Formulierung basierend auf IMDM, Sigma	10% FCS, 10% hum. AB- Serum, $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HC, 1% Pen/Strep	Kulturisolation humaner Knochenmarkfibroblasten
TEX/Asn	s. Abschnitt 2.3.4		Kultur von Insektenzellen

Tabelle 2.3: Übersicht eingesetzter Zellkulturmedien und -zusätze

Medium/ Komponente	Hersteller	Informationen zu Inhaltsstoffen	Applikation(en)
Insect Express	BioWhittaker		Kultur von Insektenzellen
HUVEC-Medium	s. Abschnitt 2.3.5		
FCS	Biochrom KG, Berlin		undefiniertes Supplement
Hum. AB-Serum	Institut für Transfusionsmedizin der MHH		undefiniertes Supplement
Hydrocortison	Sigma		Glucocorticoid
Penicillin/ Streptomycin	Gibco BRL		Antibiotika
Hum. Transferrin	Sigma		Eisen- und Proteintransport
Hum. Albumin	Sigma		Protein- und Lipidtransport
Insulin	Sigma		Energiestoffwechsel
Lipidmix	Gibco BRL		Lipidquelle
Pluronic F-68	Sigma		Scherprotektion

Legende: MHH – Medizinische Hochschule Hannover

2.3.4 T-Ex-Cell 401 (TEX/Asn)

T-Ex-Cell 401 ist ein semidefiniertes, serumfreies Medium, das aus dem pulverförmigen Fertigmedium Ex-Cell 401 (JRH Bioscience, Woodland, CA, USA) unter Supplementierung von $0,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 (Sigma, St. Louis, MO, USA), $4,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glukosemonohydrat (Merck, Darmstadt), $1,32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Glutamin (Fluka, Buchs, Schweiz) und $1,05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Asparagin (Serva, Heidelberg) hergestellt wurde. Das TEX/Asn wurde in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der GBF zur Insektenzell-basierten Proteinexpression entwickelt.

2.3.5 HUVEC Wachstumsmedium

Das Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2, Clonetics Corp., San Diego, CA, USA) wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers hergestellt mit den mitgelieferten Wachstumsfaktoren hVEGF (Human Vascular Endothelial Growth Factor), hEGF (Human Epidermal Growth Factor), hbFGF (Human Fibroblast Growth Factor – Basic) und R3-IGF-1 (Insulin Like Growth Factor-R3) supplementiert.

2.3.6 ZKT-1-Medium

Das kommerziell erhältliche ZKT-1 (Biochrom KG, Berlin) basiert auf einer 1+1 Mischung von Iscove's MDM und Ham's F12-Medium (Jäger et al., 1988). Dem Medium wurden $3,61 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 und 10% FCS zugesetzt. Das Pulvermedium wurde nach Lösung aller Komponenten in Milli-Q-Wasser mit einem AcroCap-Filter ($0,1 \mu\text{m}$, Pall Gelman Laboratory, Pall, Dreieich) sterilfiltriert.

2.3.7 Humane Wachstumsfaktoren

Tabelle 2.4 enthält alle zur Kultivierung eingesetzten Wachstumsfaktoren.

Tabelle 2.4: Übersicht humaner rekombinanter Wachstumsfaktoren.

Hersteller	Wachstumsfaktor
PeproTech EC Ltd., London, UK	Stem Cell Factor (SCF), Interleukin-3 (IL-3), Flt3 Ligand, Thrombopoetin (TPO), Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte/Monocyte-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)
Roche Diagnostics, Mannheim	Erythropoetin (EPO), Interleukin-1 β (IL-1 β)

2.3.8 Herstellung von 5637-konditioniertem Medium

25% der 5637-Zellen in einer Menge entsprechend besiedelten Fläche einer konfluenten 175-cm^2 -Zellkulturflasche wurden unmittelbar nach dem Auftauen in 20 mL RPMI 1640 + 10% FCS resuspendiert und in einer 75 cm^2 -Kulturflasche halbkonfluent ausgesät. Nach 60 h wurde der Kulturüberstand mit einer sterilen Pipette möglichst zellarm abgenommen und zweimal bei 500 g und 4°C zur sicheren Abtrennung von abgelösten 5637-Zellen zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde anschließend in ein steriles Röhrchen überführt und maximal für 4 Wochen bei 4°C gelagert (Drexler et al., 1997).

2.3.9 Konditionierung von Zellkulturüberständen

Die vorgesehenen Zelllinien und Primärzellen (siehe Tabelle 2.5) wurden aufgetaut und mit einer halbkongruenten Zelldichte in einer 175-cm²-Zellkulturflasche (Falcon) ausgesät. Nach 2 Tagen wurde das Kulturmedium mit einer Pipette abgenommen und der adhärenente kongruente Zellrasen 3-mal mit 20 mL PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ für 10 min durch leichtes Schwenken gewaschen. Mit einem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung wurde ein Ablösen der Zellen ausgeschlossen. Anschließend wurden pro Flasche 20 mL vorgewärmtes IMDM mit 2 mmol·L⁻¹ L-Glutamin zugegeben und die Konditionierungsansätze für 60 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand mit einer Pipette abgenommen, 10 min bei 200 g zentrifugiert und zellfrei bei -20° C gelagert.

Tabelle 2.5: Übersicht der zur Herstellung von konditionierten Zellkulturüberständen eingesetzten kontinuierlichen Zelllinien und Primärzellen.

Zelllinie / Primärzellen	Quelle
M2-10B4	Murine Stromazelllinie
C3H10T1/2	Murine mesenchymale Vorläuferzelllinie
SAOS-2	Humanes Osteosarkom
5637	Humanes Blasenkarzinom
Primäre humane Knochenmarkfibroblasten	Isoliert aus Kulturen humanen Knochenmarks
Primäre HUVEC	Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen, Pool aus 10 Isolationen

2.3.9.1 Konzentrierung der konditionierten Zellkulturüberstände

Die Konzentrierung der Überstände inklusiv der Negativkontrolle (IMDM) wurde mittels Zentrifugation durchgeführt. Die eingesetzten Zentrifugalkonzentratoren (Centriprep YM-3, Millipore, Eschborn) haben ein Startvolumen von 15 mL und einen nominellen Molekulargewichts Cut-off von 3.000 Da und wurden entsprechend den Herstellerangaben in einer Kühlzentrifuge (Multifuge 3_{S-R}, Heraeus, Osterode) eingesetzt. Die Konzentrierungsstrategie beinhaltete 3 direkt aufeinander folgende Dead-End-Filtrationsschritte bis zu einem Residualvolumen von 1 bis 2 mL. Anschließend wurden zwei Diafiltrationsschritte mit IMDM durchgeführt. Das finale Konzentrat wurde mit einem Filter besonders gering ausgeprägter

Proteinabsorptionsfähigkeit sterilfiltriert (Millex-GS, 0,22 µm, Millipore, Schwalbach) und bei -20° C gelagert.

2.4 *Kultivierung und Vorbereitung*

Alle für die Zellkulturen steriltechnisch relevanten Arbeiten wurden in einer Sterilwerkbank der Sicherheitsstufe II (LaminAir, HLB2472, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Als Inkubatoren für Spinner- (Spezialkulturflasche 125 mL, 2 Seitenhalse, Modell F7988, Techne Cambridge, UK) und Flaschenkulturen (25, 75, 175 cm² Falcon-Zellkulturflasche, belüftet, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) dienten in Abhängigkeit vom Natriumhydrogencarbonat-Gehalt des Kulturmediums ein CO₂-Inkubator mit 5,5% CO₂-Anteil (Cytoperm 8080, Heraeus, Hanau) bzw. ein CO₂-Inkubator mit 12% CO₂-Anteil (BB 6220, Heraeus). Der CO₂-Gehalt der Kulturatmosphäre wurde monatlich mit einem externen Messgerät kontrolliert. Die Kultivierungstemperatur wurde auf 37° C und die relative Luftfeuchtigkeit auf 95% geregelt.

2.4.1 Auftauen von Zellen

Alle Zellen wurden in Kryoröhrchen (Nalgene, Rochester, NY, USA) bei ca. -175° C in der Dampfphase über Flüssigstickstoff gelagert (K-Series, Taylor-Wharton, Theodore, AL, USA). Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in einem Wasserbad (37° C) für 2 min erwärmt und anschließend sofort mit einem mit 70%igem Alkohol getränkten Tuch von außen abgewischt. Der Inhalt wurde dann zügig in 10 mL IMDM (Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium bei Säugetierzellen) überführt und anschließend abzentrifugiert (200 g, 5 min, Digifuge^{GL} 2200®, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet abermals in 10 mL IMDM resuspendiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Die Zellen wurden bis zur späteren Verwendung in einem definierten Volumen IMDM aufgenommen und steril, bei 4° C im Kühlschrank für maximal 1 Stunde gelagert. Für Insektenzellen wurde für das Verdünnen, Waschen und Lagern TEX/Asn verwendet.

2.4.2 Kryokonservierung von Säugetierzellen

Zur Langzeitlagerung bei Tiefsttemperaturen wurden die Säugetierzellen bei 190 g abzentrifugiert (Digifuge^{GL} 2200). Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (80% (v/v) FCS, 12,5% (v/v) IMDM, 7,5% (v/v) DMSO) zu einer Konzentration von 10^6 bis 10^7 mL⁻¹ resuspendiert. Pro Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) wurden 1,9 mL Zellsuspension eingefüllt und diese für 24 Stunden in einem Gefrierbehälter (Freezing Container, Nalgene) in Isopropanol (Merck) bei -70° C gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen in die Dampfphase über flüssigem Stickstoff überführt.

2.4.3 Subkultivierung adhärenter Zellen

Nach Erreichen eines Konfluenzgrades von 80 bis 90% wurden die Zellen enzymatisch mit Trypsin abgelöst und passagiert. Dazu wurde das serumhaltige Medium vollständig abgesaugt und die Zellen mit einem geeigneten Volumen serumfreien Kulturmediums durch leichtes Schwenken gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) und die Zellen wurden für 5 bis 10 min im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Nach einer mikroskopischen Kontrolle auf Ablösung der Zellen von der Kulturflasche wurde das gleiche Volumen serumhaltigen Kulturmediums zur Inhibierung der Aktivität des Trypsins zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin zwei mal 5 min bei 200 g zentrifugiert (einmal Waschen in IMDM), und schließlich zur Vorbereitung weiterer Arbeitsschritte in 20 mL serumfreiem Kulturmedium resuspendiert.

2.4.4 Entfernung von Erythrozyten

Das Prinzip der Vollblut-Lyse beruht auf der deutlich geringeren Resistenz der kernlosen Erythrozyten gegenüber kernhaltigen Zellen (mononukleäre Leukozyten) in hypotonen Puffern. Für eine kontrollierte Reduktion der Partikelmessrate bei durchflußzytometrischen Analysen wurde bei Vollblutproben bzw. Proben mit einem hohen Erythrozytengehalt eine Reduktion der enthaltenen Erythrozyten durchgeführt. Grundlage dieser Methode war die Erythrozytenlyse auf der Basis eines EDTA-Ammoniumchlorid-Puffers (EAP, siehe Tabelle 2.6). Die Zellen wurden dazu 5 min

bei 300 g abzentrifugiert, 10^6 bis 10^8 Zellen vorsichtig in 20 mL EAP resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension abermals für 5 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und die Zellen zweimal in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des EAP zur selektiven Lyse von Erythrozyten.

Pufferbezeichnung	Zusatz
EDTA-Ammoniumchlorid-Puffer (EAP):	8,3 g·L ⁻¹ NH ₄ Cl (Merck), 2 mmol·L ⁻¹ Natrium-EDTA (Merck) ad PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

2.5 Prozessanalytik

2.5.1 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe der Trypanblau-Ausschluss-Färbung ist es möglich eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden „vitalen“ Zellen durchzuführen. Aufgrund der beschädigten Zytoplasmamembran der „toten“ Zellen kommt es zu einer selektiven Blaufärbung. Das bedeutet Trypanblau-positive Zellen (TB⁺) repräsentieren die tote Zellpopulation. Für die Durchführung der Färbung wurde die Zellsuspension, ggf. verdünnt, wenigstens auf die Anzahl von 10^5 Zellen, im Verhältnis 1+1 mit einer 0,5%-igen Trypanblau-Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim) vermischt und unter einem Mikroskop (Inversmikroskop Diaphot, Nikon, Düsseldorf) bei 400-facher Vergrößerung in einer verbesserten Neubauer-Hämozytometerkammer (Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim) ausgezählt (Walford et al., 1964). Um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu bekommen, wurden für jede Probe 2 Färbeansätze durchgeführt und je 8 Großquadrate ausgezählt.

2.5.2 Bestimmung der Zellgrößenverteilung mittels CASY

Zur Bestimmung der Größenverteilung von Zellen in Suspension wurde ein elektronisches Zellzählgerät (CASY-1® Modell TTC, Schärfe System GmbH, Reutlingen) mit einer 150 µm Kapillare eingesetzt. Das Zellzählgerät kombiniert das

Widerstandsmessprinzip zur Partikel-Puls-Messung mit einem modernen Verfahren der Pulsflächenanalyse, mit dem es möglich ist, die Größenverteilung der Zellen hochauflösend über einen weiten Messbereich (0 bis 40 μm) zu erfassen.

2.5.3 Zellkernzählung

Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl und als Kontrolle für die Trypanblau-Vitalitätszählung wurde vor allem bei starker Aggregatbildung eine Zellkernzählung durchgeführt. Dazu wurde 1 mL Zellsuspension für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert (ca. 15.000 g, Hettich Mikroliter, Hettich, Tuttlingen). 800 μL des Überstandes wurden für weitere Analysen entnommen. Das fehlende Volumen wurde mit Kristallviolettlösung (0,05% (w/v) Kristallviolett, Merck; 2,1% (w/v) Zitronensäuremonohydrat, Merck und 0,1% (v/v) Triton X-100, Sigma) aufgefüllt und anschließend sofort für eine Minute durchmischt (Vortex Genie 2, Bender&Hobein, Zürich). Die Suspension mit freigesetzten Zellkernen wurde dann in einer verbesserten Neubauer-Hämozytometerkammer bei 400-facher Vergrößerung gezählt.

2.5.4 Quantitative Bestimmung von Glukose und Laktat

Die Quantifizierung der Glukose- und Laktatkonzentration im Überstand der Kulturproben und in den verschiedenen Medien wurde nach enzymatisch-elektrochemischem Prinzip mit einem halbautomatischen Glukose-/Laktat-Analysator (Model 2700 A, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA) durchgeführt. Das Messprinzip beruht auf einer amperometrischen Messung von H_2O_2 an einer Pt/AgCl/Ag-Elektrode. Das H_2O_2 entsteht durch selektive Oxidation von β -D-Glukose zu Glucono- δ -Lacton und L-Laktat zu Pyruvat durch die beiden Enzyme Glukoseoxidase bzw. Laktatoxidase.

2.5.5 Quantitative Bestimmung freier Aminosäuren

Die Konzentration der freien Aminosäuren in Medien und Kulturüberständen wurde mit Hilfe einer HPLC-Anlage bestimmt. Nach Fällung der Proteine mit

Sulfosalicylsäure wurden die freien Aminosäuren alkalisch mit ortho-Phtaldialdehyd (OPA) in Gegenwart von Mercaptopropionsäure zu fluoreszenzfähigen Isoindolderivaten (Larsen und West, 1981) umgesetzt, anschließend über eine Reversed-Phase-HPLC (System 450 MT2, Kontron Instruments, Hamburg) (Säule: AminoOPA 3 μm , Grom, Herrenberg) getrennt und die einzelnen Peaks gegen einen internen Standard (Norvalin) quantifiziert. Die Fluoreszenzanregung und Detektion der Fluoreszenz erfolgte durch ein Spectrophotometer (SFM 25, Kontron Instruments, Hamburg).

2.5.6 Quantitative Bestimmung der freien Laktatdehydrogenase-Aktivität

Die Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH-Aktivität, E.C. 1.1.1.27) im Kulturüberstand ist ein surrogates und semiquantitatives Maß für die Anzahl lysierter Zellen im Kulturvolumen. Die Messungen zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurden mit einem Kinetikphotometer (Ultrospec 3100 pro, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) bei 37° C und einer Wellenlänge von 340 nm durchgeführt (Ryll, 1989). Die lineare Abnahme der Extinktion (dA/dt) bei $\lambda = 340$ nm wurde über einen Zeitraum von 1 min gemessen und über den molaren Extinktionskoeffizienten von ϵ_{NADH} (340 nm) = 6300 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ die Enzymaktivität automatisch durch das Gerät berechnet (s. Gleichung 2).



Berechnung der Reaktionsrate [kat L^{-1}]: $dC_{\text{NADH}}/dt = (dA_{(340\text{nm})}/dt) \cdot (1/\epsilon \cdot d)$ (2)

Dabei ist dC_{NADH}/dt = Änderung der Konzentration [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$], $(dA_{(340\text{nm})}/dt)$ = Änderung der Absorption [$\text{AU}\cdot\text{min}^{-1}$], d = Schichtdicke [cm] und ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$].

2.5.7 Messung der Osmolarität

Die Osmolarität der verschiedenen flüssigen Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien wurde durch die Messung der Gefrierpunktserniedrigung mit einem Knauer „Osmometer Automatik“ (Knauer GmbH, Berlin) entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt.

2.6 Berechnete Größen

2.6.1 Spezifische Wachstumsrate

Die spezifische Wachstumsrate μ wurde wie folgt berechnet:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad [\text{h}^{-1}] \quad (3)$$

Dabei ist die Kenntnis über X_1 der Zellzahl zum Zeitpunkt t_1 , X_2 der Zellzahl zum Zeitpunkt t_2 , t_1 dem Messzeitpunkt 1 [h] und t_2 dem Messzeitpunkt 2 [h] und $t_2 > t_1$ eine notwendige Bedingung.

2.6.2 Berechnung der Zellzahl CD34-positiver Zellen

Die Zellzahl CD34-positiver Zellen wurde aus der Trypanblauzählung ermittelten Lebendzellzahl und dem Prozentanteil CD34-positiver Zellen in der durchflusszytometrisch bestimmten Lebendzellpopulation durch Multiplikation berechnet.

2.6.3 Berechnung der Zellzahl Kolonie-bildender Zellen

Die Zellzahl der verschiedenen bestimmten Kolonie-bildenden Zellen (Colony-Forming Units – CFUs) wurde aus der Zellzahl CD34-positiver Zellen (s. Abschnitt 2.6.2) und der Klonogenität der bestimmten CFUs bezogen auf CD34-positive Zellen durch Multiplikation berechnet. Die Klonogenität wurde aus der Anzahl identifizierter

gewachsener Kolonie bezogen auf die Anzahl eingesäter CD34-positiver Zellen rechnerisch bestimmt.

2.6.4 Berechnung der Zahlen der Cobblestone-Area Forming Cells

Die Zellzahl der Cobblestone-Area Forming Cells (CAFC) wurde aus der Zellzahl CD34-positiver Zellen, wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben, und der Klonogenität der CAFC bezogen auf CD34-positive Zellen durch Multiplikation berechnet.

2.6.5 Zellspezifische Bildungs- und Verbrauchsraten

Die zellspezifischen Glukoseaufnahme- und Laktatbildungsrate wurde nach Kratje und Lincoln (1992) wie folgt berechnet:

$$C_{si,x} = \frac{C_1 - C_2}{(t_2 - t_1) \cdot \sqrt{(X_1 \cdot X_2)}} \quad [\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (4)$$

Dabei sind C_1 und X_1 die Glukosekonzentration bzw. Zellzahl zum Zeitpunkt t_1 , C_2 und X_2 die Glukosekonzentration bzw. Zellzahl zum Zeitpunkt t_2 , t_1 der Messzeitpunkt 1 [s] und t_2 der Messzeitpunkt 2 [s].

2.6.6 Arithmetischer Mittelwert

Der arithmetische Mittelwert ist ein Näherungswert für den wahren Wert einer Messreihe und wurde wie folgt berechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad (5)$$

Dabei ist \bar{x} der arithmetische Mittelwert und x_i der einzelne Messwert mit $i=1$ bis n und $n \geq 3$.

2.6.7 Standardabweichung

Die Standardabweichung σ_{mx} oder auch mittlere quadratische Abweichung des Mittelwertes ist ein Maß für die Schwankung der Messwerte um den wahren Wert und wurde wie angegeben berechnet:

$$\sigma_{mx} = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (6)$$

2.6.8 Variationskoeffizient

Der Variationskoeffizient („Coefficient of Variancy“ – CV) wurde für die durchflusszytometrische Analyse (s. Abschnitt 2.7.1) automatisch (CellQuest Pro®-Software) als prozentuale Angabe des Streuungsmaßes wie folgt berechnet:

$$CV = \frac{\sigma_{mx}^2}{\bar{x}} \cdot 100\% . \quad (7)$$

2.6.9 Fehlerfortpflanzung

Die Angabe eines experimentellen Messwertes ist immer verbunden mit der Angabe des Messfehlers. Dieser dient als Qualitätsmaß, um die Güte des Ergebnisses richtig einschätzen zu können. In dieser Arbeit wurden alle Messwerte, wenn nicht anders angegeben, in der Form $x = \bar{x} \pm \sigma_{mx}$ dargestellt. Bei einigen Ergebnissen handelt es sich um so genannte zusammengesetzte Größen, die aus additiver bzw. multiplikativer Verknüpfung ihrer fehlerbehafteten Mittelwerte hervorgegangen sind. Nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz lässt sich der Gesamtfehler der bekannten Mittelwerte inklusive ihrer Standardabweichungen ($\bar{x}_a \pm \sigma_{mx,a}$, $\bar{x}_b \pm \sigma_{mx,b}$, ...) wie folgt berechnen:

$$F_{\text{tot}} / \bar{x}_R = \sqrt{\left(\left(\frac{\sigma_{mx,a}}{\bar{x}_a} \right)^2 + \left(\frac{\sigma_{mx,b}}{\bar{x}_b} \right)^2 + \dots \right)} \quad (8)$$

Dabei ist F_{tot} der zusammengesetzte Fehler der verknüpften einzelnen fehlerbehafteten Größen $(\bar{x}_a \pm \sigma_{mx,b}, \bar{x}_b \pm \sigma_{mx,a}, \dots)$ und \bar{x}_R die aus den Mittelwerten berechneten Größe.

Für den zusammengesetzten und berechneten Wert inklusive des totalen Messfehlers (F_{tot}) folgt dann:

$$X_R = \bar{x}_R \pm F_{\text{tot}} \quad \text{mit} \quad \bar{x}_R = f(\bar{x}_a, \bar{x}_b, \dots) \quad (9)$$

Aufgrund der begrenzten Menge der zur Analyse verfügbaren Zellen war es bei der durchflusszytometrischen CD34-Messung nicht immer möglich eine statistisch relevante Anzahl von Messungen durchzuführen. In diesen Fällen wurde ein 15%iger Fehler angenommen (persönliche Mitteilung, Dr. Lubomir Arseniev, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover).

2.6.10 Relative spezifische Wachstumsfaktoraktivität

Die relative spezifische Wachstumsfaktoraktivität wurde nach einer von Jordan et al. (1972) entwickelten Methode der Probit-Analyse („Probability“, Wahrscheinlichkeitsanalyse) durchgeführt. Für die Analyse wurden die Ergebnisse des ^3H -Thymidineinbaus (cpm/Vertiefung) als auch des WST-1-Tests verwendet. Als Grundlage dienten die Aktivitätsdaten als Funktion der Konzentration der Wachstumsfaktoren. Das Prinzip beruht auf einer grafischen Auswertung des Probit-Diagramms. Auf der Ordinate wurde die relative prozentuale Aktivität des Standardmaterials (*E. coli*) sowie des Insektenzell-produzierten IL-3 bzw. SCF bezogen auf die höchste Aktivität des Standards aufgetragen. Auf der Abszisse wurde der zur Basis 2 logarithmierte relative Verdünnungsfaktor der entsprechenden Konzentration zur höchsten Aktivität des Kontrollmaterials aufgetragen. Die verschiedenen Proben wurden mit dem *E. coli*-Standard, der als 100%-Aktivität definiert wurde, auf dem 50%-Aktivitätsniveau verglichen (vergl. z. B. Abschnitt 3.5.6.8 Biologische Aktivität des rekombinanten Interleukin-3). Die relative Aktivität konnte bei gleicher Konzentration eingesetzten Standards und Wachstumsfaktors direkt abgelesen werden.

2.7 Durchflusszytometrie

Die multiparametrische Durchflusszytometrie basiert auf der gleichzeitigen Analyse des mit der Zellgröße korrelierenden Vorwärtsstreulichts (*engl.* Forward Scattered Light, FSC), des mit der Zellgranularität korrelierenden Seitwärtsstreulichts (*engl.* Side Scattered Light, SSC) und bis zu vier verschiedenen Fluoreszenzsignalen von hydrodynamisch fokussierten Einzellsuspensionen, die sequenziell mit konstanter Geschwindigkeit an einem Messpunkt vorbeigeführt werden (Melamed, 1990; Shapiro, 1994; Owens und Loken, 1995). Die Analyse von Oberflächenantigenen und des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACSCalibur®, Becton-Dickinson) durchgeführt. Zur Ausrüstung des Gerätes gehörte ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Für die Steuerung des Gerätes und Auswertung der Analysen stand die CellQuest Pro®-Software (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) auf einem PowerMac G3® (Apple Computer Systems, Cupertino, CA, USA) zur Verfügung.

2.7.1 Durchflusszytometrische Analyse CD34-positiver Zellen

Für die durchflusszytometrische Analyse der Zellen wurden $5 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ Zellen dreimal in 200 μL PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und bei 200 g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 120 μL CD45/34-Färbelösung (siehe Tabelle 2.7) resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert.

Tabelle 2.7: Färbelösungen für die CD34-Analyse und –Kontrolle.

Lösung	Bestandteile
CD45/34-Färbelösung	Antikörper: 20 μL Maus anti-CD34-PE (Klon 581, Coulter Immunotech, Krefeld) 20 μL Maus anti-CD45-FITC (Klon J33, Coulter Immunotech) 80 μL PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
Kontrollantikörperlösung	je 20 μL Ziege anti-Maus IgG-FITC und –PE-Konjugat (Coulter Immunotech) 80 μL PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

Die Zellen wurden daraufhin wiederum dreimal in 5 mL PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und innerhalb einer Stunde analysiert. Als Negativkontrolle wurde die gleiche Zellzahl mit einem beliebigen anti-Maus IgG zur Isotypen-Kontrolle inkubiert und identisch behandelt. Als Positivkontrolle wurde die konstitutiv CD34-exprimierende KG-1a-Zelllinie verwendet, die ebenfalls identisch behandelt wurde.

Die Auswertung der Daten, insbesondere die Gating-Strategie, wurde angelehnt an das Protokoll der „International Society of Hematotherapy and Graft Engineering“ (ISHAGE, „Clinical Guidelines for CD34⁺ cell quantitation in PB and PBSC products“) zur Bestimmung von CD34⁺-Zellen (Sutherland et al., 1996). Die vier-parametrische Methode (SSC, FSC, CD45-Expression und CD34-Expression) ist bereits mehrfach beschrieben worden (Bender et al., 1991; Keeney et al., 2003; Reis, 1999; Gratama et al., 2003). Für die Identifizierung lebender Zellen wurde eine zusätzliche Färbung jeder analysierten Probe mit Propidiumjodid (*engl.* Propidium Iodide, PI), einem Nukleinsäurefarbstoff, der in die DNA toter Zellen interkaliert (Shankey et al., 1993), durchgeführt. Dazu wurde jeder Probe nach CD34-Analyse jeweils 10 μL einer PI-Stammlösung ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) zugegeben und sofort in Fluoreszenzkanal 2 bzw. 3 analysiert.

2.7.2 Durchflusszytometrische Analyse apoptotischer Zellen

Die Analyse lebender, apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer Zellsuspension wurde mit dem kombinierten Einsatz einer Annexin-V- und PI-Färbung durchgeführt (Vermees et al., 1995). Basis dieser Analyse bilden charakteristische Veränderungen in der Plasmamembran apoptotischer Zellen. In apoptotischen Zellen ist bei intakter Zellmembran das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren Oberfläche der Plasmamembran auf die äußere Seite translokalisiert. Auf diese Weise wird PS der extrazellulären Umgebung präsentiert. Annexin-V ist ein 35 bis 36 kD großes Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität gegenüber PS aufweist (Raynal und Pollard, 1994). Es bindet an Zellen die PS intrazellulär oder extrazellulär präsentieren. Ein mit einem Fluorochrom konjugiertes Annexin-V-Molekül kann sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen für durchflusszytometrische Analysen markieren. Zur Diskriminierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde der Vitalfarbstoff PI eingesetzt. Die Zusammensetzung der Färbelösung ist in Tabelle 2.8 aufgeführt. Die DNA wird

aufgrund der Durchlässigkeit der Plasmamembran ausschließlich in nekrotischen Zellen angefärbt.

Tabelle 2.8: Färbelösung für die Annexin-V-/Propidiumjodid-Analyse.

Lösung	Bestandteile
Annexin-V/PI-Färbelösung	10 mmol·L ⁻¹ HEPES (Sigma, St. Louis) 140 mmol·L ⁻¹ NaCl (Sigma) 5 mmol·L ⁻¹ CaCl ₂ (Sigma) 1:100 Annexin-V-FLUOS-Stammlösung (Pharmingen, San Diego, USA) 20 µg·mL ⁻¹ Propidiumjodid (Sigma) pH 7,4, NaOH

2.8 Kurzzeit-Kulturassays (CFU-Assays)

Für die Quantifizierung und Identifizierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen wurde der so genannte Colony-Forming Cell-Assay oder Colony-Forming Unit-Assay (CFC- oder CFU-Assay) eingesetzt. Die 14-tägige Kurzzeitkultur der Zellen, war vor der Einführung durchflusszytometrischer Methoden wichtigstes Mittel für die Analyse von hämatopoetischen Zellen und Zellkulturen. Die Technik liefert eine relevante Information über die Funktionalität von hämatopoetischen Vorläuferzellen und hat ihre Bedeutung als Qualitätskontrolle sowohl in der Transplantationspraxis als auch in einem breiten Spektrum wissenschaftlicher Fragestellungen bewiesen. Die Entwicklung von semisoliden Kulturmedien, Medien hoher Viskosität, ermöglicht bei ausreichender Verdünnung die distinkte Bildung von Kolonien. Die fortschreitende Entdeckung von spezifischen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gestattet die gezielte Stimulation der Vorläuferzellen verschiedener Differenzierungslinien (Testa und Molineux, 1993).

Für die Kultivierung wurde die notwendige Anzahl an CD34⁺-Zellen (150 bzw. 300) in 100 µL IMDM resuspendiert. Die Suspension wurde zu 1,4 mL Methylzellulose gegeben und durchmischt (10 s, höchste Stufe, Vortex Genie 2, Bender&Hobein). Es wurden 50 bzw. 100 CD34⁺-Zellen in 500 µL modifiziertem Methylzellulose-Medium (siehe Tabelle 2.9) pro Loch einer 24-Lochplatte kultiviert. Randständige Löcher wurden mit sterilem Milli-Q-Wasser gefüllt. Zur Verbesserung der statistischen Aussage der Ergebnisse wurden Zellen des Inokulums im Dreifachansatz und

spätere Proben im Doppelansatz kultiviert. Die Ansätze wurden auf die Zahl der CD34⁺-Zellen ausgelegt, da Stamm- und Vorläuferzellen weitgehend innerhalb dieser Population vermutet werden (siehe Abschnitt 1.1.2.1).

Tabelle 2.9: Zusammensetzung des modifizierten CFU-Kulturmediums.

Medium	Bestandteile
modifiziertes Kulturmedium	Grundmedium GF 4534 ohne Erythropoetin, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Kanada 1 Unit·mL ⁻¹ rh-Erythropoetin, Roche, Mannheim 20 µg·mL ⁻¹ rh-G-CSF, PeproTech EC, London, UK

Die morphologische Identifizierung der Kolonien wurde nach den im Jahr 1995 von Eaves und Lambie erarbeiteten Kriterien aus dem „Atlas of Human Hematopoietic Colonies“ (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Kanada) durchgeführt. Für die Berechnung der Frequenzen innerhalb der CD34⁺ Zellpopulation wurden folgende Vorläufer getrennt analysiert:

- CFU-G (Colony-Forming Unit – Granulocyte = Kolonie-bildende Einheit für Granulozyten) wurde separat identifiziert und gezählt;
- Die CFU-E (Colony-Forming Unit – Erythroid = Kolonie-bildende Einheit für Erythrozyten) und die BFU-E (Burst-Forming Unit – Erythroid = unreifere koloniebildende Einheit für Erythrozyten) wurden zusammen identifiziert und gezählt (siehe Abbildung 1.3.A);
- CFU-M (Colony-Forming Unit – Macrophage = Kolonie-bildende Einheit für Makrophagen) wurde separat identifiziert und gezählt;
- CFU-GM (Colony-Forming Unit – Granulocyte/Macrophage = Kolonie-bildende Einheit für Granulozyten und Makrophagen) wurden entsprechend dem hämatopoetischen Modell jeweils einmalig den granulozytären und monozytären Vorläufern zugezählt;
- CFU-GEMM (Colony-Forming Unit – Granulocyte/Erythroid/Macrophage/Megacaryocyte = Kolonie-bildende Einheit für Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen und Megakaryozyten) wurden entsprechend dem hämatopoetischen Modells jeweils einmalig den granulozytären, erythrozytären, monozytären und megakaryozytären Vorläufern zugezählt.

2.8.1 CFU-Meg (CFU-Meg-Assay)

Megakaryozytäre Progenitoren sind in der Lage in Methylzellulose-Medien Kolonien unterschiedlicher Größe zu bilden: CFU-Meg (Colony-Forming Unit – Megakaryocyte). Sie zeigen jedoch eine hohe Sensitivität gegenüber dem inhibierenden Effekt von TGF- β (Transforming Growth Factor-Beta), welcher Bestandteil der klassischen Methylzellulosemedien aufgrund der Zugabe von FCS ist. Die Beeinträchtigung ist teilweise so stark, dass optimales Wachstum megakaryozytärer Kolonien nicht mehr gewährleistet ist und ein separater Test entwickelt werden musste. Der FCS-freie CFU-Meg-Assay unterstützt auch das Wachstum und die Differenzierung granulozytärer und monozytärer Zellen. Letztere können jedoch lichtmikroskopisch nur äußerst schwierig von megakaryozytären Zellen unterschieden werden. Dieses Problem machte es notwendig Megakaryozyten immunhistochemisch über die Expression des CD61-/CD41-Antigens (gp IIb/IIIa) zweifelsfrei zu identifizieren. Dem verwendeten Medium (Megacult C-Kit®, StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) wurde neben einer für CFU-Megs optimalen Zytokinkombination Kollagen zugesetzt, um die beweglichen Megakaryozyten in der entstehenden Gel-Matrix zu immobilisieren.

Für die Kultivierung wurde die notwendige Anzahl an Zellen in 100 μ L IMDM resuspendiert. Der Suspension wurden 2,0 mL Megakaryozyten-Medium (Megacult C-Kit®, StemCell Technologies) zugesetzt und sorgfältig durchmischt (5 s, höchste Stufe, Vortex Genie 2). Den 2,1 mL Zellsuspension wurde anschließend 1,2 mL Kollagenlösung (Megacult C-Kit®, StemCell Technologies) zugegeben und wiederum sorgfältig durchmischt (10 s, höchste Stufe, Vortex Genie 2). Es wurden 2.500 bzw. 5.000 CD34⁺-Zellen in 1.650 μ L Kultur-Medium pro 35·10 mm Kulturschale (Nunc, Wiesbaden) kultiviert. Je 4 Kulturschalen wurden zusammen mit einer mit sterilem Milli-Q-Wasser gefüllten Schale in einer 144·20 mm Kulturschale (Nunc) gesammelt und für 12 Tage inkubiert. Für eine statistische Absicherung der Ergebnisse wurden die Zellen des Inokulums als Dreifachansatz und spätere Proben im Doppelansatz kultiviert. Der Transfer der zuvor zu dehydrierenden Kollagenkulturmatrizes auf einen Objektträger und die lichtmikroskopische APAAP-Färbung (Megacult C-Kit®, StemCell Technologies) wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Identifizierung der positiven Kolonien wurde nach den angegebenen Kriterien des Herstellers (StemCell Technologies) vorgenommen.

(siehe Abbildung 1.3.B). Für die Berechnung der Frequenzen innerhalb der $CD34^+$ Zellpopulation wurde ein Minimalkriterium für eine CFU-Meg-Kolonie von drei $CD61$ -positiven, räumlich zusammenhängenden Zellen festgelegt.

2.8.2 Cobblestone-Area Forming Cell-Assay (CAFC-Assay)

Der CAFC-Assay, ein teilweise standardisierter Langzeitkultur-Assay für hämatopoetische Zellen, diente dem Nachweis von sehr frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Aufgrund der Kulturbedingungen, 5 bis 6 Wochen Kokultur auf Stromazellen, kommt es zu einer gezielten Unterstützung unreifer Stammzellen. Reifere Vorläufer, z. B. CFU-G, differenzieren unter den gewählten Kulturbedingungen aus, verlieren ihre Adhärenzfähigkeit, sterben ab und werden bei den Halbmediumwechseln teilweise entfernt. Der Nachweis wurde in Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Als stromale Zellen wurde die mit 30 Gy (STS Irradiator, Typ 0B29/926-2, STS GmbH, Braunschweig) bestrahlte M2-10B4 Zelllinie verwendet. Dieses bedeutet eine gewisse Standardisierung des Systems im Vergleich zur Nutzung primärer Knochenmarkfibroblasten als Feederzellen. Nach vollständiger Adhäsion der stromalen Zellen wurden die hämatopoetischen Zellen in 6 verschiedenen Verdünnungen auf die Platte aufgetragen. Dabei wurde bei 500 $CD34^+$ -Zellen pro Vertiefung begonnen und mit 1:2 Verdünnungsschritten bis auf 18 $CD34^+$ -Zellen pro Vertiefungen verdünnt. Die Verdünnungsstufen wurden als 10-facher Parallelansatz angelegt, wobei die randständigen Vertiefungen mit sterilem Milli-Q-Wasser gefüllt wurden. Nach 6 Wochen Kultur (37°C , 5% CO_2) konnte der Testansatz mit einem Inversmikroskop ausgelesen werden. Zweimal in der Woche wurde ein Halbmediumwechsel durchgeführt. Die Zusammensetzung des Kulturmediums ist in Tabelle 2.10 aufgeführt.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung des CAFC-Kulturmediums.

Medium	Bestandteile
CAFC-Kulturmedium	Myelocult H5100, StemCell Technologies 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco) 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hydrocortison (Sigma, unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt)

CAFC bilden unter den beschriebenen Bedingungen charakteristische räumlich zusammenhängende Cluster oder Kolonien, die an Kopfsteinpflaster erinnern (s. Abbildung 2.1). Enthielt eine Vertiefung mindestens 6 Cobblestone-Zellen (Cobblestone-Area) dann wurde diese Vertiefung als positiv bewertet. Andernfalls wurde die Vertiefung als negativ bewertet (Freshney et al., 1994).



Abbildung 2.1: Cobblestone-Area Forming Cells (CAFC) innerhalb eines Feederlayers aus mittels γ -Bestrahlung wachstumsarretierten M2-10B4-Zellen. CAFC bilden unter optimalen Bedingungen nach 3 bis 6 Wochen Kultur Kolonien aus Kopfsteinpflaster-ähnlichen Zellen. Das Foto wurde mit einem Inversmikroskop mit ungeeigneter Phaseneinstellung aufgenommen, um den Kontrast zu verstärken.

Nach dem von Lefkovits und Waldmann (1975) beschriebenen Single-hit-Poisson-Modell existiert eine lineare Beziehung zwischen der durchschnittlichen Anzahl der Zellen pro Verdünnungsstufe und dem Anteil an negativen Vertiefungen pro Verdünnungsstufe in der Form (Waldmann et al., 1975):

$$\ln(p_i) = -f \cdot x_i \quad \text{oder} \quad p_i = e^{-f \cdot x_i} \quad (10)$$

Dabei ist p_i – Anteil der negativen Vertiefungen pro Verdünnungsstufe, f – Frequenz der gesuchten Subpopulation, x_i – Zahl der pro Vertiefung in der i -ten Verdünnungsstufe eingesäter Zellen.

Die mathematischen Grundlagen für die Auswertung eines „Limiting Dilution Assays“ (LDA) hat Taswell (1981) beschrieben. Da die exakten Methoden nur zeitintensiv mittels iterativer Ansätze zu lösen sind, wurde für die Berechnung der CAFC-

Frequenzen innerhalb der CD34⁺-Population ein PC-gestütztes Programm verwendet. Das Programm ist in GW-Basic geschrieben und für die Analyse von experimentellen Daten aus „Limiting Dilution Assays“ (Bonnefoix und Sotto, 1991) geeignet. Die Funktionsweise des Programms und die Richtigkeit der Ergebnisse wurden im Vorwege anhand repräsentativer Daten manuell überprüft. Das Programm „Bonnefoix“ kann über die ftp-Seite: jim.mscs.mu.edu/pub/bonnefoix als Freeware erhalten werden und ist ausführbar auf IBM-kompatiblen PCs.

2.9 *Produktion und Aufreinigung von Wachstumsfaktoren*

2.9.1 Insektenzellkultur und Stammhaltung

Die beiden Insektenzelllinien (Sf9 und High 5) wurden in 50 mL (125-mL-Spinnerflasche, Techne, Cambridge, UK) und 100 mL (500-mL-Spinnerflasche, Techne) Kulturmedium bei 80 min⁻¹ bzw. 130 min⁻¹ und 27° C kultiviert. Die Passagierung erfolgte zweimal wöchentlich. Die Kulturen wurden durch Entnahme von Zellsuspension und Zugabe frischen Mediums jeweils auf eine Zelldichte von 3·10⁵ mL⁻¹ eingestellt. Die Sf9 Zellen wurden in TEX/Asn und die High 5 in TEX/Asn und Insect Express kultiviert.

2.9.2 Produktion rekombinanter Wachstumsfaktoren im Bioreaktor

Die Produktion der rekombinanten Proteine wurde in einem 2,5 Liter Glasbioreaktor (GBF, Eigenbau, Typ 2.0, Jahr 1993; Gasversorgungsstation von MKS Instruments Deutschland GmbH, München) durchgeführt. Der Reaktor war mit einem Hohlfasermembran-Taumelrührer zur schonenden Durchmischung bei blasenfreier Begasung (Accurel® PPS6/2F, Innendurchmesser: 1,8 mm; Außendurchmesser: 2,6 mm; mittlere Porenweite: 0,3 µm, Membrana, Wuppertal) ausgestattet. Das Inokulum der Insektenzellen betrug 3·10⁵ mL⁻¹. Die Insektenzellen wurden bei einer Lebendzelldichte von 1,3 bis 2,5·10⁶ mL⁻¹ mit einer MOI von 1 infiziert. 72 Stunden nach der Infektion wurde die Zellsuspension 30 min bei 2.000 g in einer Kühlzentrifuge (Cryofuge 8000, Heraeus) bei 4° C zentrifugiert. Der zellfreie

Überstand wurde in 500 mL Aliquots unsteril bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.9.3 Isolierung von His₍₆₎-Tag-Fusionsproteinen

Zunächst wurden 500 mL des eingefrorenen Überstandes im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Der Überstand wurde in einer Zentrifuge (Typ RC5c, Rotor: GSA, Kendro Laboratory Products, Langenselbold), bei 10.000 g und 4°C für 15 min von Kryoaggregaten abgetrennt. Anschließend wurde der klare Überstand über Nacht gegen $50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer, $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7,4, dialysiert (Spectra/Por, 3.500 MWCO, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA). Dabei wurde ein minimales Volumenverhältnis von 1/10 eingehalten und der Puffer wurde nach 12 Stunden komplett erneuert. Der pH-Wert des Dialysates wurde dann mit 5N NaOH auf pH 8,0 justiert und eine Konzentration von $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Imidazol (Sigma) mit Hilfe einer $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Stammlösung eingestellt. Der Überstand wurde abschließend mit einem $0,45\text{ }\mu\text{m}$ Filter in einem Vakuumfiltrationsgerät (125 mL, $0,45\text{ }\mu\text{m}$, Renner, Dannstadt-Schauernheim) von verbliebenen Aggregaten getrennt. Das Packen der Säule mit dem Talon-Metall-Affinitätsharz (TALON[®], Metal Affinity Resins, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) wurde entsprechend der Empfehlung des Hersteller durchgeführt. Die Äquilibration der Säule wurde mit zehnfachem Säulenvolumen eines Puffers bestehend aus $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Imidazol, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Phosphatpuffer, $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl bei pH 8,0 durchgeführt. Anschließend wurde die Säule mit dem auf pH 8,0 justierten Überstand mit einer Flussrate von $3,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ beladen. Anschließend wurde die Säule mit zehnfachem Säulenvolumen eines Puffers bestehend aus $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Imidazol, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Phosphatpuffer, $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl bei pH 8,0 gewaschen, um unspezifische Bindungen zu lösen. Für die Elution der His₍₆₎Tag-Proteine wurde ein $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Imidazol, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Phosphatpuffer, $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl pH 8,0 verwendet. Sechs 2mL-Fractionen wurden separat aufgefangen und getrennt einer Proteinbestimmung (siehe Abschnitt 2.10.1) und einer Reinheitsabschätzung mittels SDS-PAGE mit sensitiver Silberfärbung unterzogen.

Fractionen mit hoher Reinheit (geschätzt: $> 90\%$) wurden vereint und über Nacht bei 4°C gegen PBS (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.11), pH 7,4 mit einem

minimalen Volumenverhältnis von 1/100 dialysiert (Slide-a-Lyzer® Dialysekassetten, 10.000 MWCO, Pierce Chemical, Rockford, IL, USA). Abschließend wurde eine finale Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt und das Protein mit einem Schutzprotein-haltigen Kulturmedium (1% BSA in IMDM, beides Sigma) versetzt, sterilfiltriert (Millex-GS, 0,22 µm, Millipore) und aliquotiert bei -70 °C gelagert.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung des PBS-Puffers nach Dulbecco.

Puffer	Bestandteile
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung	0,2 g·L ⁻¹ Kaliumchlorid
	0,2 g·L ⁻¹ Kaliumdihydrogenphosphat
	0,1 g·L ⁻¹ Magnesiumsulfat · 7 H ₂ O
	8,0 g·L ⁻¹ Natriumchlorid
	2,16 g·L ⁻¹ Di-Natriumhydrogenphosphat · 7 H ₂ O

2.10 Proteinanalytik und –Charakterisierung

2.10.1 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce) mit dem mitgelieferten Albumin-Standard entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Messung der Farbreaktion wurde ein Photometer (Ultrospec 3100 pro, Amersham Pharmacia Biotech) verwendet.

2.10.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Trennung von Proteinen wurde nach der Methode von Laemmli (1970) eine Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) in vertikalen Gelkammern (Mini-Protean II, Biorad, München) durchgeführt. Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde sichergestellt, dass eine Auftrennung nach der individuellen Molekülmasse erfolgte. Die proteinhaltigen Proben wurden in 4-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen, der Mercaptoethanol (Sigma) zur Denaturierung enthielt, und 10 min bei 95° C inkubiert. Nach dem Auftrag von jeweils 20 µl

unverdünnter Fraktionsprobe auf das Sammelgel wurde bis zum Eindringen in das Trenngel bei 60 V und danach für 60 bis 90 min bei 180 V und 50 mA elektrophoretisiert. Zur Standardisierung wurde der Größenmarker Broad Range (Biorad) von 7 bis 200 kDa benutzt. Es wurden parallel zwei Trenngele erzeugt. Das erste wurde einer spezifischen Silberfärbung unterzogen. Das zweite Gel wurde für das Western-Blotting verwendet. Die Zusammensetzungen des Elektrophoresepuffers, des Probenpuffers, sowie die Formulierung des 4,5%igen Sammelgels und des 15%igen Trenngels für die SDS-PAGE sind in Tabelle 2.12 aufgeführt.

Tabelle 2.12: Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers, des Probenpuffers, sowie die Formulierung des 4,5%igen Sammelgels und des 15%igen Trenngels für die SDS-PAGE.

Lösung/Puffer	Bestandteile
Probenpuffer	1 mL 0,5 mol·L ⁻¹ Tris-HCl; pH 6,8; 4 mL Wasser; 0,8 mL 30% (v/v) Glycerin (Sigma); 1,6 mL 10% SDS (Sigma); 0,05% Bromphenolblau (Sigma); 2,5% Mercaptoethanol (Sigma)
Sammelgel (4,5%)	0,75 mL Acrylamid/Bisacrylamid (30%) (Roth, Karlsruhe); 1,25 mL Trenngelpuffer (0,5 mol·L ⁻¹ Tris-HCl; pH 6,8; 0,4% SDS); 3 mL Milli-Q-Wasser; 70 µL APS (10%ig) (Sigma); 7 µL TEMED (Sigma)
Trenngel (15%)	5,4 mL Acrylamid/Bisacrylamid (30%); 2,7 mL Sammelgelpuffer (1,5 mol·L ⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% SDS); 2,7 mL Milli-Q-Wasser; 100 µL APS (10%ig); 16 µL TEMED
Elektrophoresepuffer	0,25 mol·L ⁻¹ Tris-HCl; 0,25 mol·L ⁻¹ Glycin; pH 8,3; 0,1% SDS

2.10.3 Silberfärbung der Gele

Die Silberfärbung der SDS-Page wurde mit dem „Silver Stain Staining-Kit“ (Owl, Owl Separations Systems, Portsmouth, NH, USA) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Entwicklungszeit betrug je nach Menge aufgetragenen Proteins 5 – 10 min um eine Überentwicklung der Gele zu vermeiden.

2.10.4 Western-Blotting

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mit einer „Trans-Blot® Semidry-Transfer Cell“ (BioRad) nach Angaben des Herstellers auf eine Immobilon® PVDF-Membran (Millipore) transferiert. Die hydrophobe Membran wurde zuerst mit Methanol aktiviert,

dann zusammen mit dem Proteingel 10 min in Transferpuffer (siehe Tabelle 2.13) äquilibriert. Das Blotting erfolgte in Transferpuffer für 1 Stunde bei 45 mA pro Minigel. Zur Transferkontrolle wurde eine reversible Ponceau S-Färbung (Serva, Heidelberg) durchgeführt.

Tabelle 2.13: Zusammensetzung des Transferpuffers für das Western-Blotting.

Lösung/Puffer	Bestandteile
Transferpuffer	48 mmol·L ⁻¹ Tris-Base; 39 mmol·L ⁻¹ Glycin; 0,037% SDS, 20% Methanol (Riedel de Haën, Seelze)

2.10.5 Immunchemischer Nachweis der Proteine auf der PVDF-Membran

Zur Identifikation der Proteine durch spezifische Antikörper wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung (TBST mit 3% BSA) abgesättigt. Anschließend folgte die Inkubation der primären monoklonalen Antikörper in TBST mit 3% BSA für 1 Stunde. Die Membran wurde danach dreimal für jeweils 5 min in TBST gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde inkubiert.

Tabelle 2.14: Materialien für die immunchemische Identifizierung von Proteinen auf der Blotting-Membran.

Lösung/Puffer	Bestandteile
TBST	50 mmol·L ⁻¹ Tris-Base ; 137 mmol·L ⁻¹ NaCl ; 3 mmol·L ⁻¹ KCl ; pH 7,0 ; 0,05% Tween-20
Blockierungslösung	TBST + 3% bovines Serumalbumin (BSA) Maus anti-His-Tag (Dianova, Hamburg) Ziege anti-SCF (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) Ziege anti-IL-3 (R&D Systems) Maus anti-Ziege-AP (Dianova) Ziege anti-Maus IgG-AP (Promega)

Dieser war mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Die Waschschritte erfolgten wie zuvor beschrieben. Die Membran wurde unter fließendem Wasser gespült und anschließend trocken getupft. Zur Detektion der

Proteine wurde die „Western Blue Stabilized Substrate“ Lösung (Promega, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Eine Übersicht aller eingesetzten Materialien befindet sich in Tabelle 2.14.

2.10.6 Proteinsequenzierung

Die Identifizierung der Proteine wurde durch die Arbeitsgruppe Proteinsequenzierung der GBF durchgeführt. N-terminale Sequenzierung wurde mit Hilfe automatisierter Sequenatoren (473A und 494A (Procise Klein), Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) die nach dem Prinzip des Edman-Abbaus arbeiten, durchgeführt. Die Probe wurde auf einem mit Polybren beschichteten Glassfilter gebunden und den Abbaureaktionen ausgesetzt. Die Aminosäuren wurden mit einem automatischen Aminosäureanalysator (Model 420 A/H, Perkin Elmer) identifiziert. Die durchschnittlich erhaltene Sequenzlänge betrug 17 Aminosäuren und wurde mit einer vom Hersteller ausgelieferten Software ausgewertet.

2.10.7 Quantitative Bestimmung der Wachstumsfaktoraktivität

2.10.7.1 ^3H -Thymidineinbau-Test

Die quantitative Bestimmung der biologischen Aktivität der produzierten Wachstumsfaktoren erfolgte über die Messung des Einbaus radioaktiv markierter Thymidinanaloga in die DNA der obligat IL-3 und SCF-auxotrophen Leukämiezelllinie M-07e. $3 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung wurden in Dreifachansätzen in 100 μL einer 96-Lochplatte (Falcon, Becton-Dickinson) ausgesät und für 48 Stunden in einem CO_2 -Inkubator bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein Zusatz von 20% 5637-konditioniertem Medium verwendet (siehe Abschnitt 2.3.8). 4 Stunden vor Ende des Tests wurde 1 μCi Methyl- (^3H) -Thymidin (Amersham Life Science, Braunschweig) pro Vertiefung dazugegeben. Für einen direkten Vergleich der spezifischen biologischen Aktivität wurde ein kommerziell erhältliches humanes Interleukin-3 (PeproTech EC, London, UK) aus E. coli benutzt. Das lyophilisierte Material aus E. coli wurde nach den Herstellangaben rekonstituiert. Einzelne Aliquote wurden bei -20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.10.7.2 WST-1-Test

Als Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau-Test und zur Abschätzung der Zellzahl bzw. Vitalität der Zellen wurde das kolorimetrische WST-1 Cell Proliferation Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) entsprechend den Herstellerangaben benutzt. Hierbei wurde die Aktivität der analysierten Wachstumsfaktoren auf Zellproliferation und Vitalität ebenfalls anhand der M-07e-Zelllinie bestimmt. Die Kultivierung der Zellen wurde exakt wie oben beschrieben durchgeführt mit Ausnahme der initialen Zelldichte, hier $1,5 \cdot 10^4$ Zellen pro Vertiefung und einer verlängerten Inkubationszeit von 5 Tagen. Am Ende der Inkubationszeit wurden 10 μL WST-1-Lösung pro Vertiefung dazugegeben und die 96-Lochplatte für weitere 4 Stunden inkubiert. Alle 30 min wurde die 96-Loch-Platte vorsichtig geschüttelt und die Absorption mit einem ELISA-Reader (340 ATTC, SLT, Labinstruments, Crailsheim) bei 450 nm gemessen.

2.11 *Aufbau des Bioreaktorsystems*

Die Bioreaktorkultivierungen wurden in einem individuell zusammengestellten und modifizierten Komplettsystem der Fa. Meredos GmbH, Bovenden, durchgeführt. Die drei Bioreaktoren besaßen zur Minimierung des Arbeitsvolumens ein selbst entworfenes, konisches Reaktorgefäß, das ein Arbeitsvolumen von 25 mL bis 120 mL zur Verfügung stellte (siehe Abbildung 2.14). Der Deckel war aus PEEK (Polyetheretherketon) und die entsprechenden acht mal 5 mm bzw. vier mal 8 mm Deckel-Durchführungen waren aus PEEK und rostfreiem Edelstahl gefertigt, so dass der komplette Reaktor inkl. Sonden und Schlauchsystem in einem Dampfautoklaven bei 121°C für 30 min sterilisiert werden konnte. Die gesamte Mess- und Regelungstechnik des Systems wurde über „mfs“ (Meredos Ermenter Steuerung, Meredos) kontrolliert. Die Thermostatisierung des Systems auf 37°C erfolgte über einen Doppelmantel, der mit einem Thermostat (MGW Lauda) verbunden war. Die Temperaturkontrolle im Reaktorgefäß wurde über einen PT-1000-Sensor durchgeführt. Die Durchmischung des Systems wurde mit einem selbst entwickelten „Marine Impeller“-Rührer mit einem Anstellwinkel der Rührblätter von 45° ermöglicht. Der Abstand der Rührblätter zum Boden (12,5 mm) und auch zur seitlichen Wand (3 mm), die als charakteristische Abmessungen angesehen werden, wurde konstant gehalten.

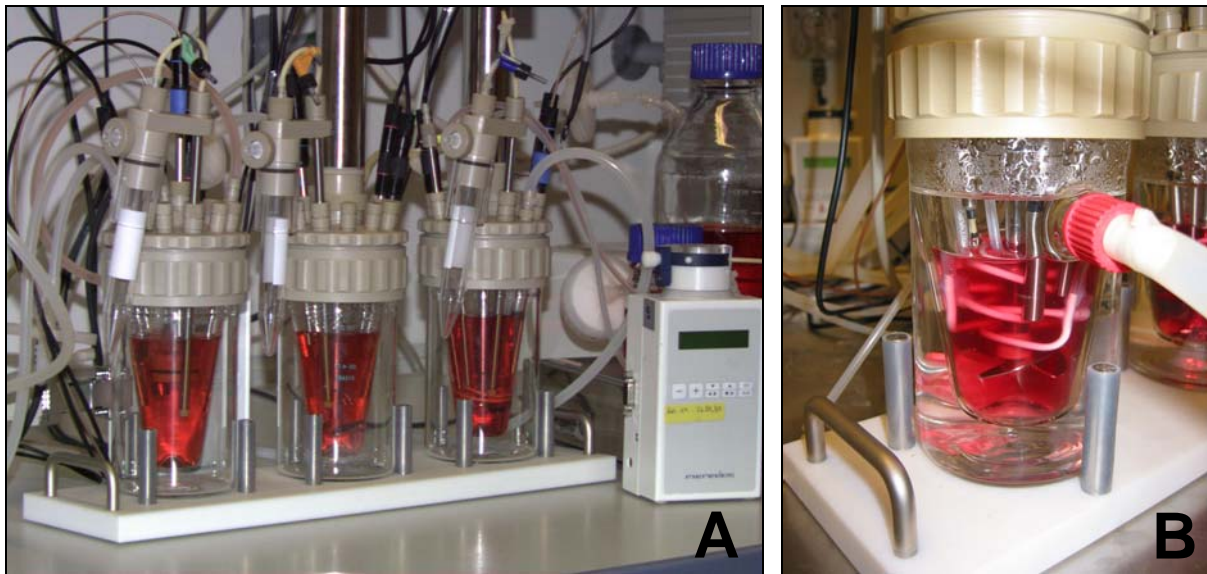


Abbildung 2.14: Miniaturisiertes Dreifach-Bioreaktorsystem (Fa. Meredos, Bovenden) mit Schlauchpumpe (A). Die Begasung wurde blasenfrei über eine installierte Membran realisiert (B).

Die Rührerdrehzahl wurde den zellspezifischen Anforderungen angepasst und war im Bereich von 0 bis 100 min^{-1} frei wählbar. Die Begasung des Systems wurde über die Gasmischstation „mcu 2000“ (Meredos Controlling Unit, Meredos) ermöglicht. Die drei Reaktorgefäße konnten separat manuell oder automatisiert mit Kombinationen der vier Gase (Sauerstoff, Stickstoff, Kohlendioxid und Luft) separat Massflowcontroller-geregelt, versorgt werden. Der Anteil des Kohlendioxids in der Begasungsatmosphäre wurde durch die Natriumhydrogencarbonat-Konzentration im Kulturmedium vorgegeben und betrug zumeist 5,5% CO_2 . Ein integrierter Gelöstsauerstoff-Partialdruck-Regler realisierte über die Zumischung der anderen drei Gase die Regelung des Gelöstsauerstoff-Partialdrucks (pO_2). Die Messung des pO_2 wurde über eine speziell entwickelte 6-mm- pO_2 -Sonde durchgeführt, die nach dem Prinzip der polarografischen Sauerstoffmessung arbeitet. Die Verbindung zwischen Gasversorgungsstation, Gasmischeinheit und Reaktorgefäß wurde, um störende Sauerstoff-Diffusion besonders bei kleinen Volumenströmen durch die Schlauchwand zu minimieren, aus einem gas- und dampfdichten Iso-Versinic-Schlauch aus Viton (Saint-Gobain, Courbevoie, Frankreich) aufgebaut. Als Zuluftfilter diente ein dampfsterilisierbarer $0,2 \mu\text{m}$ Gasfilter (Millipore). In die Abluftstrecke wurde ein selbst entwickelter Rückflusskühler (Material: Glas, Eigenbau GBF Glaswerkstatt) installiert, um eine Aufkonzentrierung des Kulturmediums und damit eine Erhöhung der Osmolarität durch entweichenden Wasserdampf im Abgas zu verhindern.

Verschiedene Kulturführungsstrategien konnten je nach Ausstattung des Systems realisiert werden.

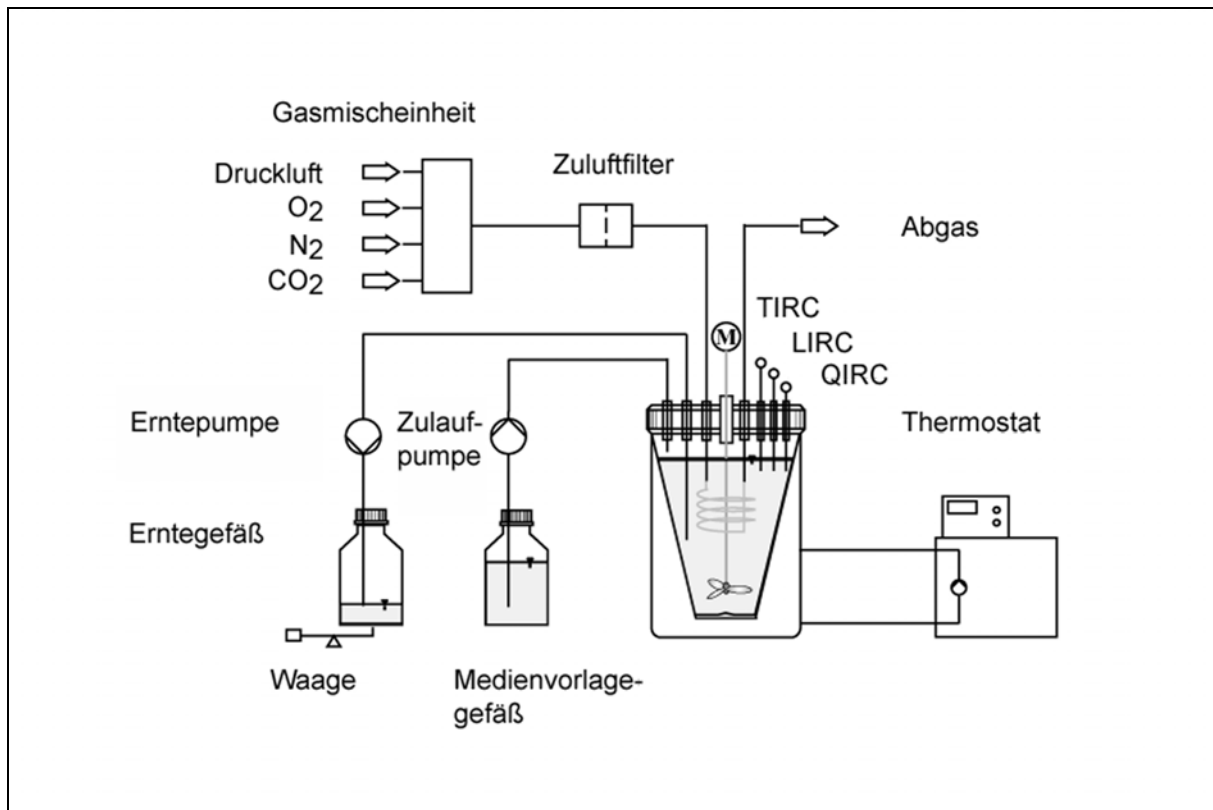


Abbildung 2.15: Meredos-Bioreaktoranlage (1 Kulturgefäß) für blasenfreie Begasung und kontinuierliche Betriebsweise. Die Anlage bestand aus: Gasmischeinheit mit 4 Massflowcontrollern (Regel-/Stellbereich: 0 – 100 mL min⁻¹), Zuluftfilter, Erntepumpe, kalibrierbarer Zulaufpumpe, TIRC („Temperature – Indication – Registration – Control“, System aus PT-1000 und Thermostat), LIRC (Level-IRC, Füllstandssonde und -algorithmus), QIRC (pO₂-Meßsonde und Regelalgorithmus), Erntegefäß mit gravimetrischer Messung und einem mit einem Eisbad auf 4° C gekühlten Medienvorlagegefäß.

Der Perfusionsbetrieb, konnte über die Installation einer kalibrierbaren Zufuhr-(HP-10, Meredos) und Erntepumpe (Korrekturmittelpumpe, Meredos) realisiert werden. Beide Pumpen, ausgestattet mit Santoprene-Pumpenschläuchen (1,02 mm Innendurchmesser, 0,84 mm Wandstärke, Advanced Elastomer Systems, Akron, OH, USA), wurden über den Füllstandsregler gesteuert, der den Flüssigkeitsspiegel im Reaktorgefäß mit einem kapazitiven Füllstandssensor überwachte. Die Menge des aus dem System entfernten Mediums wurde gravimetrisch (Precisa Waage 6200, Dietikon, Schweiz) bestimmt und kontinuierlich aufgezeichnet. Der Aufbau des Reaktorsystems ist in Abbildung 2.15 dargestellt.

2.11.1 Blasenfreie Begasung im Meredos Bioreaktorsystem

Zur Vermeidung von zellschädigendem Scherstress durch Blasenbegasung wurde die blasenfreie Begasung eingeführt. Diese wurde mit einer Accurel® Membran (PP S6/2 F, Membrana GmbH, Wuppertal) mit $0,33 \text{ cm} \cdot \text{mL}^{-1}$ Kulturvolumen durchgeführt. Zur stabilen Positionierung der Begasungseinheit wurde in das Lumen der Membran ein Edelstahldraht eingeführt, der ca. ein Fünftel des Querschnitts ausfüllte. Diese Membran konnte installiert mit dem Reaktorsystem dampfsterilisiert werden.

2.11.2 Kontinuierliche Medienperfusion mit Zellrückhaltung

Für die Einrichtung einer kontinuierlichen Medienperfusion bei gleichzeitiger Rückhaltung der Zellen wurde ebenfalls die in Abschnitt 2.11.1 beschriebene Membran verwendet. Dafür wurde diese 1 Stunde vor Installation in den Bioreaktor zur Hydrophilisierung in 100% Ethanol bei Raumtemperatur eingelegt. Ein Ende der Membran wurde über einen Deckelport mit der Erntepumpe verbunden. Das andere Ende wurde verschlossen. Auf diese Weise konnte das verbrauchte Medium zellfrei abfiltriert werden.

2.12 Charakterisierung des Bioreaktorsystems

2.12.1 Bestimmung der Mischzeitkonstante

Die Mischzeit ist definiert als die Zeit, die notwendig ist, um örtliche Konzentrationsunterschiede bis zu einem bestimmten Homogenitätsgrad abzubauen. Die Betrachtung der Mischzeit ist vorwiegend bei Verfahren von Interesse, bei denen kontinuierlich oder diskontinuierlich Substanzen (Substrat, Säure, Lauge) zugegeben werden. Vielfach besteht die Forderung, diese Stoffe so schnell wie möglich in der Nährlösung zu verteilen. In Zellkulturreaktoren mit geringen Volumina, insbesondere in gerührten Systemen bei submerser Kultivierung der Zellen, ist die Mischzeit keine kritische Größe. Der Grund dafür liegt darin, dass die Zeit zur Verarbeitung der an die Zellen herangetragenen Stoffe wesentlich länger ist, als die Zeit, die zum Konzentrationsausgleich in der Nähe der Membran benötigt wird. Die Abschätzung

der Mischzeit lässt jedoch ein Rückschluss darauf zu, wie nah die neu entwickelten Bioreaktoren als gerührtes System an den idealen Zustand des ICSTR (Ideal Continuous Stirred Tank Reactor) herankommen. Zur Bestimmung des Mischzeitverhaltens wurde ein Spurstoff stoßartig in den Reaktor eingebracht und die Zeit bis zur Einstellung eines 90% Homogenitätsgrads ermittelt. Bekannte Verfahren sind die Messung der Leitfähigkeit, der Temperatur oder des pH-Wertes. In dieser Arbeit wurde die pH-Wert-Methode gewählt. Es wurde in einem pH-Bereich von 7 bis 4 mit Säurezugabe gearbeitet. Die Messung erfolgte unter Einspritzung einer definierten Menge 5 N HCl in ein definiertes Volumen ungepufferten destillierten Wassers mit einem Start-pH-Wert von exakt 7,0 eingestellt mit NaOH ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) und HCl ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Die zeitliche Entwicklung des pH-Wertes wurde mit einer pH-Elektrode (Meredos, Bovenden) gemessen und mit der mfs-Software aufgezeichnet. Zur Berechnung der Mischzeit musste zunächst der pH-Wert in die korrespondierende Wasserstoffionenkonzentration umgerechnet werden. Der Grund dafür liegt darin, dass a. der pH-Wert ein logarithmisches Maßsystem darstellt und b. der Zeitpunkt an dem 90% des Endwerts (τ_{90}) erreicht sind, auf diese Weise nicht direkt ablesbar ist.

$$c_{\text{H}^+} = 10^{-\text{pH}} \quad [\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}] \quad (11)$$

Mit dem Startwert (Index A) und dem Endwert (Index E) ergibt sich die relative Wasserstoffionenkonzentration τ (mit $0 < \tau < 1$).

$$\tau = \frac{c_{\text{H}^+} - c_{\text{H}^+, \text{A}}}{c_{\text{H}^+, \text{E}} - c_{\text{H}^+, \text{A}}} \quad [-] \quad (12)$$

Bei der grafischen Auftragung von τ gegen die Zeit lässt sich die Mischzeit bei Erreichen von $\tau = 0,9$ ablesen. Um sicher zu stellen, dass die Verzögerungszeitkonstante der pH-Sonde vernachlässigbar ist, wurde sie ebenfalls vorher im Bereich von pH 4 bis 7 getestet.

2.12.2 Bestimmung des Sauerstoffübergangskoeffizienten k_{La}

Zur Ermittlung der integralen Sauerstofftransportrate wurde die dynamische Methode angewendet. Sie kann mit den in den Reaktoren vorhandenen pO_2 -Sensoren auf einfache Weise durchgeführt werden. Voraussetzung für einen geringen Messfehler ist eine zuverlässige Zeitkonstante der Elektrode gegenüber der eigentlichen Messung. Die Zeitkonstante der pO_2 -Elektrode konnte mit ca. 8 Sekunden mittels Übergang im Gas zwischen reiner Luft und reinem Stickstoff bestimmt werden. Vor der Messung wurde die Elektrode unter Messbedingungen (Druck und Temperatur) in deionisiertem Wasser kalibriert. Anschließend wurde der Sauerstoff mit Stickstoff verdrängt. Während der Messung wurde der zeitabhängige Verlauf der pO_2 -Sonde mit dem mfs-Datenerfassungssystem aufgezeichnet. Zur Ermittlung der Sättigungskonzentration c_L^* wurden die Arbeiten Schumpe et al. herangezogen (Schumpe et al., 1982).

Zur Berechnung des $k_L a$ -Wertes sind mehrere Methoden bekannt, von denen zwei zur Anwendung gebracht wurden.

Methode 1: Tangenten-Methode:

Die Tangenten-Methode geht von folgender Massenbilanzgleichung für die Sauerstoffeintragsrate aus:

$$OTR = \frac{dc}{dt} = k_L a (c_L^* - c_{OL}) \quad (13)$$

mit	k_L	-	flüssigkeitsseitiger Stoffübergangskoeffizient [$m \cdot s^{-1}$]
	a	-	spezifische Phasengrenzfläche [m^{-1}]
	c_L^*	-	Definition der maximal möglichen Sauerstoff-Sättigungskonzentration in der Flüssigphase bei gegebenem Druck, Sauerstoffmolenbruch und Henrykonstante [$g \cdot L^{-1}$]
	c_{OL}	-	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase [$g \cdot L^{-1}$]

Zum Zeitpunkt $t_0=0$ gilt für die Sauerstoffkonzentration $c=0$. Durch die Ermittlung der Tangentensteigung dc/dt bzw. $\Delta c/\Delta t$ lässt sich die OTR auf einfache Weise annähern mit:

$$OTR = \frac{\Delta c}{\Delta t} \quad (14)$$

bzw.

$$k_L a = \frac{\Delta c}{\Delta t} \cdot \frac{1}{c_L^*} \quad (15)$$

Es erfolgt die Auftragung des zeitlichen Verlaufs des pO_2 -Wertes. Da $\Delta c = c_L^*$ gilt, ergibt sich der $k_L a$ -Wert gemäß Gleichung 14 einfach als Kehrwert von Δt . Da bekannt ist, bei welchem Membrandruck und welcher Temperatur gemessen wurde, lässt sich c_L^* leicht ermitteln.

Methode 2: 63%-Methode:

Die 63%-Methode geht ebenfalls von der Massenbilanzgleichung

$$OTR = \frac{dc}{dt} = k_L a (c_L^* - c_{OL}) \quad (16)$$

für die Sauerstoffeintragsrate (*engl.* Oxygen Transfer Rate, OTR) aus.

In der integrierten Form

$$k_L a = \frac{1}{t} \cdot \ln \left(\frac{c_L^*}{c_L^* - c_{OL}(t)} \right) \quad (17)$$

kann man den $k_L a$ -Wert grafisch ermitteln. Wird der Ausdruck im Logarithmus naturalis zu 1, entspricht der $k_L a$ -Wert dem Kehrwert der Zeit. Dies ist nur der Fall wenn $c_{OL}(t) = 0,63 \cdot c_L^*$ gilt. Damit wird

$$k_L a = \frac{1}{t_{63\%}} \quad (18)$$

2.12.3 Relative Sedimentationsgeschwindigkeit von Zellen

Aus der Kräftebilanz (Auftriebskraft und Widerstandskraft stehen im Gleichgewicht zur Gewichtskraft) an einem kugelförmigen Partikel in Flüssigkeit ergibt sich der folgende Ausdruck (Adaptation des Stoke'sches Gesetzes):

Danach lässt sich die notwendige Anströmgeschwindigkeit v_s , mit der ein Partikel in Schwebe gehalten werden kann, wie folgt berechnen:

$$v_s = \sqrt{\frac{4}{3} \cdot \frac{\Delta\rho \cdot d_p \cdot g}{\rho_L \cdot \psi \cdot \zeta}} \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (19)$$

mit	v_s	-	Partikelsinkgeschwindigkeit
	$\Delta\rho$	-	Dichtedifferenz zwischen Partikel und Flüssigphase, $\Delta\rho = 62$ (Monozyten/Makrophagen) bis 92 (Erythrozyten) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
	d_p	-	Partikeldurchmesser
	g	-	Erdbeschleunigung, $9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$
	ρ_L	-	Dichte der Flüssigphase, $\rho_{\text{Wasser bei } 4^\circ \text{ C}} = 999,975 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
	ψ	-	Widerstandsziffer nach Stoke, $f(\text{Reynoldszahl})$
	ζ	-	Formfaktor, 1 bei Kugelform

Aus Gleichung 18 lässt sich bei sonst identischen Bedingungen hinsichtlich des Systems (Dichtedifferenz, Dichte der Flüssigphase, Widerstandsziffer und Formfaktor) leicht die Sinkgeschwindigkeit aus einem Vergleich zweier unterschiedlich großer, kugelförmiger Partikel, repräsentativ für den Unterschied zweier Zelllinien bzw. Zellpopulationen herleiten (Gleichung 19).

$$v_{s,1} = v_{s,2} \cdot \sqrt{\frac{d_{p,1}}{d_{p,2}}} \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (20)$$

2.12.4 Berechnung der Sauerstoffaufnahme

Die Sauerstoffaufnahme einer Zellkultur lässt sich über die Zellkonzentration zu einem gegebenen Zeitpunkt t und der zellspezifischen Sauerstoffaufnahme wie folgt berechnen:

$$\text{OUR} = q_{\text{O/X}} \cdot c_{\text{X,L}} \quad [\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}] \quad (21)$$

mit $q_{\text{O/X}}$ - spezifische Sauerstoffaufnahme pro Zelle $[\text{g} \cdot \text{h}^{-1}]$
 $c_{\text{X,L}}$ - Zellkonzentration $[\text{L}^{-1}]$

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 *Isolierung CD34-positiver Zellen aus Apheresaten*

Für die Untersuchungen mit primären Zellen standen periphere Blutstammzellen aus kryokonservierten Apheresaten mit einer maximalen Lagerungsdauer von 4 Jahren zur Verfügung. Mit Hilfe der MACS-Technologie wurden CD34-positive Zellen isoliert. Spurr und Mitarbeiter haben 2002 Transplantate aus Knochenmark und peripherem Blut nach bis zu 14 Jahren Kryolagerung auf die voraussichtliche Erhaltung der klinischen Suffizienz hin überprüft und kamen in 50% der Fälle zu einem positivem Ergebnis (Spurr et al., 2002). Auch Wang et al. (2001) konnten zeigen, dass aufgetaute Zellen im Rahmen von Expansionskulturen keine signifikant schlechtere Expansionsleistung, als Kulturen frischer Zellen zeigen. Donnenberg konnte 2002 für Langzeit-kryokonservierte, autologe Knochenmarkproben mit einer Lagerungsdauer von 14 Jahren keinen signifikanten negativen Effekt auf die Vitalität oder die Klonogenität von CD34-positiven Zellen nachweisen (Donnenberg et al., 2002). Für mononukleäre und CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut konnte ebenfalls eine hohe Wiederfindung nach wenigen Wochen Kryolagerung nachgewiesen werden.

Die Selektion CD34⁺-Zellen aus kryokonservierten Leukapheresaten, ist aufgrund der Lyse von Zellen und der damit verbundenen Freisetzung großer Mengen DNA häufig mit praktischen Schwierigkeiten verbunden. Das führt in der Transplantationspraxis dazu, dass die notwendige CD34⁺-Isolierung vor einer Kryokonservierung durchgeführt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde nach Positiv-Selektion für CD34⁺-Zellen eine mittlere Reinheit $47 \pm 17\%$ (n=9, Bereich: 16 bis 71%) und eine mittlere Wiederfindung von $70 \pm 7\%$ (n=9, Bereich: 17 bis 110%) erreicht (Abb. 3.1). Nach dem Auftauen der Leukapheresate für die Selektion wurde regelmäßig eine starke Aggregatbildung der Zellen beobachtet, was dazu führte, dass sowohl die Reinheit als auch die mittlere Wiederfindung hinter den Erwartungen zurück blieb. Die Aggregate konnten zwar durch eine DNase-Behandlung (DNase Pulmozyme, Hoffmann-La-Roche) größtenteils aufgelöst werden, welches die Vermutung zulässt, dass diese durch Zelllyse von Granulozyten und die damit verbundene Freisetzung von DNA ausgelöst wurde. Auf diese Weise konnte die Verblockung der Säulenmatrix mit zellulären Aggregaten minimiert werden. Beck und Mitarbeiter

konnten ebenfalls anhand von aufgetauten Nabelschnurblutzellen nachweisen, dass DNase geeignet ist Aggregatbildung zu unterbinden, ohne dabei zelluläre Adhäsionsmoleküle anzugreifen (Beck et al., 2003).

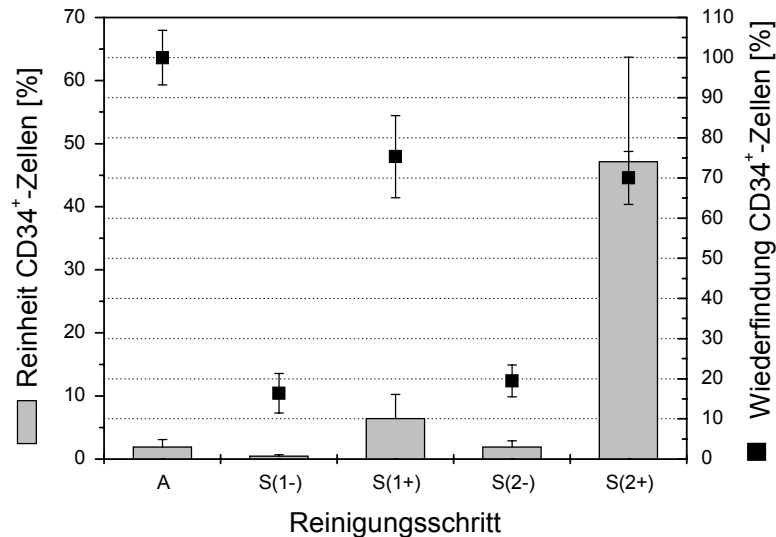


Abbildung 3.1: Reinheit und Wiederfindung CD34⁺-Zellen in den Reinigungsschritten der MACS-Aufreinigungen (n=9). Angegeben sind Ergebnisse der einzelnen Reinigungsstufen: A, Ausgangsmaterial nach spezifischer Bindung der magnetischen Nanopartikel, S(1-), „CD34-negative“ Fraktion der 1. Säule, S(1+), CD34-positive Fraktion der 1. Säule, entsprach dem Ausgangsmaterial für die Säule 2, S(2-), „CD34-negative“ Fraktion der 2. Säule und S(2+), CD34-positive Fraktion der 2. Säule, die für eine anschließende Kultivierung verwendet wurde.

Mit der von Miltenyi entwickelten und 1990 publizierte Technik des MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) werden Zellpopulationen zu wissenschaftlichen Fragestellungen und mit dem Ziel des klinischen Einsatzes isoliert (Miltenyi et al., 1990). De Wynter und Mitarbeiter haben 1995 die seinerzeit gängigen Methoden zur Zellisolation im Labormaßstab verglichen (De Wynter et al., 1995). Sie konnten anhand von Zellen aus verschiedenen Quellen (KM, CB, PBMNC) zeigen, dass die MACS-Methode mit 72% Reinheit und über 62% Wiederfindung die besten Ergebnisse erzielte. Bereits 1993 erreichte die Gruppe um Kato und Radbruch an der Universität in Köln für ihre Charakterisierungsstudien Reinheiten von 38 bis 87% und eine Wiederfindung von 39 bis 74% an CD34-positiven Zellen aus peripherem Blut (Kato und Radbruch, 1993). Im Jahr 1996 erreichten Servida und Mitarbeiter dank herstellerseitig verbesserter Reagenzien und Protokolle eine durchschnittliche Reinheit von ca. 90% und Ausbeuten von 43% CD34-positiver Zellen aus Knochenmark (Servida et al., 1996).

3.2 *Identifizierung des Basalmediums*

3.2.1 Einfluss des Basalmediums auf die Kultivierung

Für die Entwicklung eines Zellkulturprozesses mit dem Ziel der Generierung einer klinisch relevanten Zahl von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen stellt die Identifizierung des hierfür optimalen Grund- oder Basalmediums eine wichtige Anforderung dar. Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen an das Medium wird die Auswahl unter anderem von der Quelle der eingesetzten Zellen bestimmt: Knochenmark, Nabelschnurblut (Sandstrom et al., 1996) oder aufgereinigte Populationen CD34-positiver ($CD34^+$) Zellen (Koller et al., 1998b).

Ziel der Untersuchungen war die Identifizierung eines Mediums, das eine signifikante Expansion von reifen sowie unreifen Vorläuferzellen unterstützt. Der Einfluss von fünf kommerziell erhältlichen Kulturmedien auf Proliferation und Differenzierung von $CD34^+$ -Zellen wurde untersucht. Die Kulturmedien wurden von den jeweiligen Herstellern alle speziell für die Bedürfnisse von humanen hämatopoetischen Zellen entwickelt. Eine Übersicht über die eingesetzten Basalmedien befindet sich in Abschnitt 2.3.3.

Die drei dazu durchgeführten statischen Kulturen wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen mit einem Medienvolumen von 5 mL durchgeführt und mit einer Startzellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ $CD34^+$ mL⁻¹ inokuliert. Der Reinheitsgrad der $CD34^+$ -Zellpopulation im Inokulum betrug > 95%. Für die umfangreiche Zellanalytik wurden repräsentative Parallelkulturen nach 48, 96, 144, 168, 192 und 240 h Kultur untersucht. Sowohl nach Literaturangaben (Sandstrom et al., 1996; Sandstrom et al., 1994; Koller et al., 1998b; van den Oudenrijn et al., 2001) als auch eigenen Erfahrungen wurde die maximale Expansion früher und intermediärer Vorläuferzellen unter den gewählten Kulturbedingungen innerhalb der ersten 168 bis 216 Stunden erwartet.

Den Basalmedien wurden neben humanem AB-Serum (4%), 2 mmol L⁻¹ L-Glutamin, 50 U·mL⁻¹ Penicillin, 50 µg·mL⁻¹ Streptomycin, 1 µmol·L⁻¹ Hydrocortison, 10 µmol·L⁻¹ Monothioglycerin auch Wachstumsfaktoren zugesetzt: 25 ng·mL⁻¹ SCF, 300 U·mL⁻¹ IL-1β, 20 ng·mL⁻¹ IL-3 und 300 U·mL⁻¹ IL-6. Hydrocortison, dessen inaktivierende Wirkung auf Monozyten (Szeffler et al., 1989) und proliferative Wirkung auf eine Vielzahl von Zelltypen (Hoshi et al., 1984) nachgewiesen werden konnte, wurde

innerhalb des Standardkonzentrationsbereichs von 1 bis 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ eingesetzt. Vorversuche in Multiwell-Platten auf der Basis eines kolorimetrischen Vitalitäts- und Proliferationstests (WST-1-Test) konnten fast eine Verdopplung der zellulären Aktivität durch die Zugabe von Hydrocortison nachweisen. Sandstrom und Mitarbeiter fanden bei einer Zugabe von Hydrocortison eine 50% Erhöhung der Gesamtzellzahlen (Sandstrom et al., 1996). Lin und Hsu konnten bereits 1985 zeigen, dass eine Zugabe von antioxidativ wirkenden Molekülen, wie Monothioglycerin oder 2-Mercaptoethanol, zu einer Verbesserung des Wachstums aufgrund einer Verringerung der Sauerstofftoxizität führt (Lin und Hsu, 1985).

3.2.2 Einfluss des Basalmediums auf Gesamtzellexpansion und Vitalität

Als erster Parameter wurde der Einfluss des Basalmediums auf die Expansion leicht- und nicht-adhärenter Zellen untersucht. Ziel war es dasjenige Medium zu identifizieren, welches die Stamm- und Vorläuferzell-Expansion am besten unterstützt. In Abbildung 3.2 ist der zeitliche Verlauf der Expansion leicht- und nicht-adhärenter Zellen dargestellt.

In allen Medien wurde eine signifikante Zellexpansion erreicht. Die anfängliche Reduktion der Zellkonzentrationen während der ersten 48 h, lässt sich vermutlich erstens auf die Adaptation des zellulären Anabolismus und Metabolismus auf geänderte Umgebungsbedingungen (Latenz- bzw. Lag-Phase) und zweitens auf eine irreparable Schädigung der Zellen durch die vorausgegangene Kryokonservierung zurückführen. Die höchsten Expansionsfaktoren wurden in allen Medien jeweils nach 192 h der Kultivierung gefunden (Ausnahme: AIM V mit 240 h). Die größte Expansion wurde im StemSpan SFM (24-fach) und CellGro SCGM (23-fach) erreicht. Die Ergebnisse korrelieren mit Zellkonzentrationen von maximal $2,4\cdot 10^6\text{ mL}^{-1}$. De Bruyn und Mitarbeiter haben 2003 mit StemSpan 2000, einer Weiterentwicklung des StemSpan SFM (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Kanada) auf der Basis von selektierten CD34-positiven Zellen aus Nabelschnurblut und einer Wachstumsfaktorkombination von SCF, IL-3, G-CSF und Flt-3 Ligand einen Expansionsfaktor von 17 für die Gesamtzellzahl erreicht (De Bruyn et al., 2003). Zum Vergleich konnten Lam und Mitarbeiter 2001 ebenfalls mit CD34-selektierten Nabelschnurblutzellen mit StemSpan SFM supplementiert mit TPO, SCF, Flt-3

Ligand, G-CSF und IL-6 einen Gesamtzellexpansionsfaktor von 19,5 erreichen (Lam et al., 2001). Sandstrom und Mitarbeiter haben 1996 ausführliche Untersuchungen zum Thema Kulturmedien für hämatopoetischen Vorläuferzellen durchgeführt. Sie verglichen eine Reihe serumhaltiger und serumfreier kommerzieller, veröffentlichter und selbst entwickelter Medien (Sandstrom et al., 1996). Das Ergebnis: AIM V und X-Vivo 15, beide ursprünglich für die Kultur von Lymphozyten optimiert, zeigten im direkten Vergleich mit Stempro-34 eine nur leicht verringerte Expansion der Gesamtzellzahl und eine um den Faktor 2 verringerte Expansion der Koloniebildenden Einheiten (siehe Abschnitt 3.2.6).

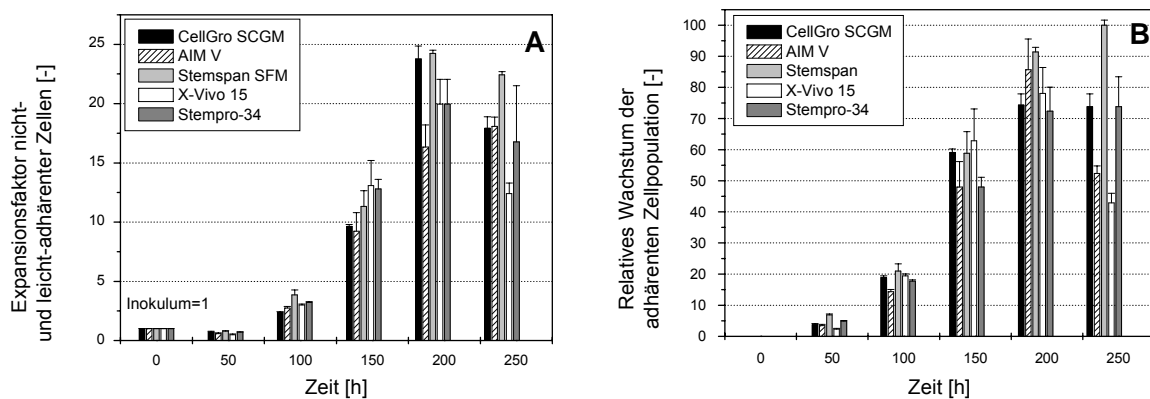


Abbildung 3.2: (A) Einfluss des Basalmediums auf die Gesamtzahl nicht- und leicht-adhärenter hämatopoetischer Zellen. Die Expansionsfaktoren wurden relativ zur Startzelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen pro 25-cm^2 -Zellkulturflasche berechnet. (B) Einfluss des Basalmediums auf die Gesamtzahl adhärenter Zellen. Die Ergebnisse wurden auf die maximal erreichte Zahl adhärenter Zellen ($5,3 \cdot 10^5$ Zellen pro 25-cm^2 -Zellkulturflasche) zu 100% normiert.

48 h nach Inokulation konnte in den statischen Kulturen mikroskopisch eine adhären Zellpopulation entdeckt werden, die sich ausschließlich durch Trypsinisierung gewinnen ließ. Scott und Mitarbeiter definierten in der Plastik-adhären Subpopulation von PBSCs autologer Spender den P Delta Progenitor (Scott et al., 1997). Dabei handelte es sich um einen Zelltyp der nach 2 bis 18 Stunden primärer Adhärenzzeit in 7-, 14- und 21-tägiger Kultur nicht-adhären CFU-GM generierte. Einen ebenfalls unreifen adhären Zelltyp isolierten Kuci und Mitarbeiter nach 3 bis 5 Wochen Kultur aus CD133-selektierten, mobilisierten Blutstammzellen. Sie konnten zeigen, dass dieser CD133-positive Zelltyp weder hämatopoetische, mesenchymale noch endotheliale oder dendritische Oberflächenantigene exprimierte. Diese Zellen waren in der Lage nach Transplantation im NOD/SCID-Maus-Modell eine multilineare Regeneration der

Hämatopoese hervorzurufen (Kuci et al., 2003). Die Zellen wurden bei der Zellernte mittels Trypsinierung gewonnen, allerdings nicht separat analysiert. Ihr relativer Anteil bezogen auf die nicht- und leicht-adhärenenten Zellen betrug maximal $5,2 \pm 1,1\%$. Der zeitliche Verlauf der Zellzahl der adhärenenten Zellfraktion ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Die Darstellung erfolgt prozentual bezogen auf die maximale Zellzahl von $5,3 \cdot 10^5$ Zellen nach 240 h, die mit dem StemSpan SFM erreicht wurde. Das Ergebnis war zu dem Zeitpunkt zu den anderen Medien signifikant höher.

Die kürzesten Populationsverdopplungszeiten der leicht- und nicht-adhärenenten Zellen konnten zwischen 96 und 144 h Kultivierung bestimmt werden. Diese lagen im Bereich von 18,38 h (X-Vivo 15) bis 24,07 h (CellGro SCGM). Die Vitalität der Zellen wurde vergleichend ermittelt. Es wurde die Trypanblau-Färbung und Annexin-V/Propidiumjodid-Färbung eingesetzt. Die Ergebnisse für die leicht- und nicht-adhärenente Zellpopulation sind als Funktion der Zeit in Abbildung 3.3. dargestellt. Die durchflusszytometrisch ermittelten prozentualen Anteile der lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen ergeben analysebedingt in ihrer Summe keinen Wert von 100%, da bei jeder Messung ein geringer Anteil von Zellen detektiert wurde, der keiner der definierten Gruppen eindeutig zugeordnet werden konnte. Die Vitalität der Zellen nach dem Auftauen betrug im Mittel 70%. Von diesem Niveau aus stieg die Vitalität der Zellen in allen Ansätzen über 192 h auf über 90% an. Nach 240 h Kultur sank die Vitalität in allen Ansätzen wieder deutlich ab. Die Ergebnisse der Annexin-V-Färbung bestätigen die höhere Vitalität im AIM V nach 240 h, die sowohl auf geringere Anteile apoptotischer aber auch nekrotischer Zellen zurückgeführt werden konnte (nekr.: 20,5%, apopt.: 10%). Die Gruppe mit CellGro SCGM und Stempro-34 zeigen zu diesem Zeitpunkt marginal erhöhte Anteile nekrotischer bzw. apoptotischer Zellen. In der Gruppe mit StemSpan SFM und X-Vivo 15, die ebenfalls erhöhte Werte aufwiesen, schien es, als sei dies auf eine Medienerschöpfung als Folge starken Wachstums zurückzuführen. Daraufhin wurde eine Analyse der Glukose-, Laktat-Werte und des Aminosäurenverbrauchs durchgeführt, um Limitationen seitens Metabolit-Akkumulation bzw. Erschöpfung der Glukose oder des Aminosäurepools aufzudecken (siehe Abschnitt 3.2.3). Eine direkte Übertragung der Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung der Trypanblau-Färbung auf den Anteil lebender Zellen aus den Ergebnissen der Annexin-V-Färbung ist nicht möglich. Ein Vergleich der beiden Methoden zeigt dies im folgenden Abschnitt 3.2.2.1.

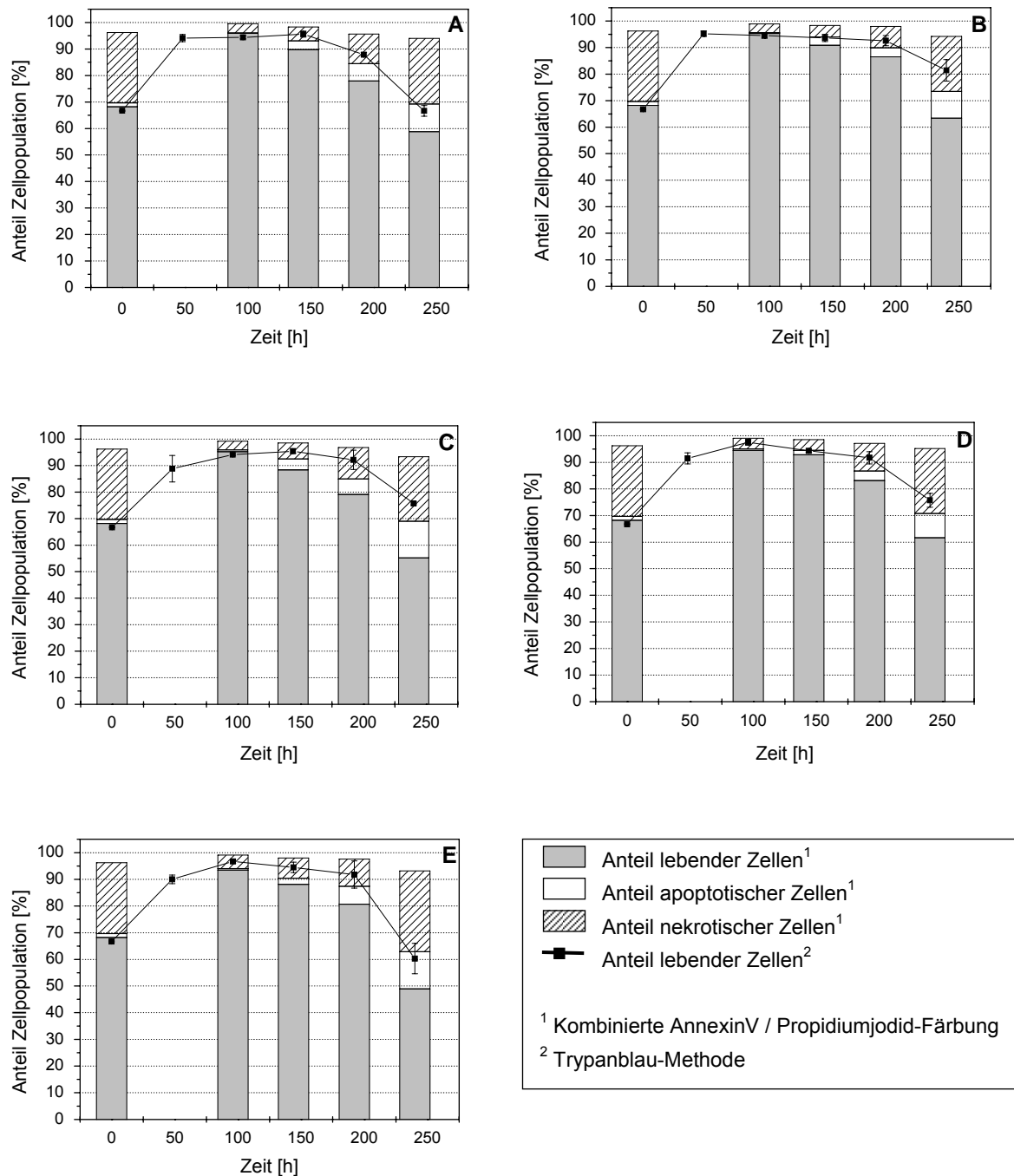


Abbildung 3.3: Einfluss des Basalmediums auf die Vitalität leicht und nicht-adhärenter Zellen. Es sind Ergebnisse der Trypanblau- (Punkt-Linien-Diagramm) und der kombinierten Annexin-V-/Propidiumjodid-Färbung (Balkendiagramm) in fünf verschiedenen Medien gezeigt (CellGro SCGM (A), AIM V (B), StemSpan SFM (C), Stempro-34 (D) und X-Vivo 15 (E)).

Im CellGro SCGM und StemSpan SFM wurden die höchsten Gesamtzell-Expansionsfaktoren mit 23 bzw. 24 erreicht. Das StemSpan SFM zeigte hinsichtlich Proliferation und Differenzierung von frühen und reifen Vorläuferzellen die besten Ergebnisse. Die Resultate der Medien bezüglich der Entwicklung des Anteils oder Gehaltes CD34-positiver Zellen waren mit anderen Medien vergleichbar. Während in

den anderen Medien eine Expansion im Bereich von 3,5- bis 5-fach nachzuweisen war, konnte im StemSpan SFM eine 4-fache Expansion gezeigt werden. Die Ergebnisse stimmen mit den von De Bruyn und Mitarbeitern überein, die mit dem StemSpan 2000 auf der Basis CD34⁺-selektierter Zellen aus Nabelschnurblut und einer Wachstumsfaktorkombination von SCF, IL-3, G-CSF und Flt-3 Ligand einen Expansionsfaktor von 6-fach für die CD34-positive Zellpopulation erreicht haben (De Bruyn et al., 2003). Lam und Mitarbeiter erreichten mit dem StemSpan SFM für CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut eine 6,7-fache Vermehrung (Wachstumsfaktoren: TPO, SCF, Flt-3 Ligand, G-CSF, IL-6; Lam et al., 2001). Yao und Mitarbeiter erreichten unter Verwendung des StemSpan H2000, einem dem SFM hinsichtlich Grundzusammensetzung und Serumsubstituten nahezu identischem Medium, und einer Kombination aus SCF, FL, IL-3 und IL-6 innerhalb von 7 Tagen Kultur eine Expansion von 26,4-fach für CD34⁺-Zellen und 8,9-fach für die Gesamtzahl an Zellen (Yao et al., 2004).

3.2.2.1 Korrelation zwischen Trypanblau- und Annexin-V-Färbung

In diesem Abschnitt soll die Korrelation der Vitalität einer Zellpopulation ermittelt aus Trypanblau- und Annexin-V/Propidiumjodid-Färbung untersucht werden. Ergebnisse von Vitalitätsbestimmungen mit beiden Methoden sind in Abbildung 3.4 gegeneinander aufgetragen. Die Kriterien der Trypanblau-Färbung definieren lichtmikroskopisch Trypanblau-negative Zellen als lebendig. Die durchflusszytometrische Annexin-V-Analyse definiert Ereignisse als lebende Zellpopulation, die sich a. hinsichtlich ihrer relativen Zellgröße und –granularität als lebende Zellen einordnen lassen und b. relativ zu Kontrollzellen keine signifikante Fluoreszenz vermittelt durch die Bindung von Annexin-V noch die Aufnahme von Propidiumjodid aufweisen. In Abbildung 3.4 sind die Ergebnisse aus 8 repräsentativen Kulturen aufgetragen. Hinzugefügt wurde die Gerade einer idealen Regression, die identische Resultate aus beiden Methoden repräsentiert. Die Ergebnisse wurden in Gruppen zusammengefasst, um sie besser auswerten zu können.

Eine gute Übereinstimmung wurde für die erste Gruppe, die Gruppe der Inokula, d.h. frisch aufgetauter Zellen erreicht. Diese zeigte eine gute Korrelation mit $-2,8 \pm 7,3\%$ ($p=n.s.$). Ein negatives Vorzeichen wurde als eine relative Überschätzung der Vitalität

durch die Annexin-V-Methode definiert. Die zweite Gruppe umfasste die Ergebnisse der frühen Kultivierungsphase.

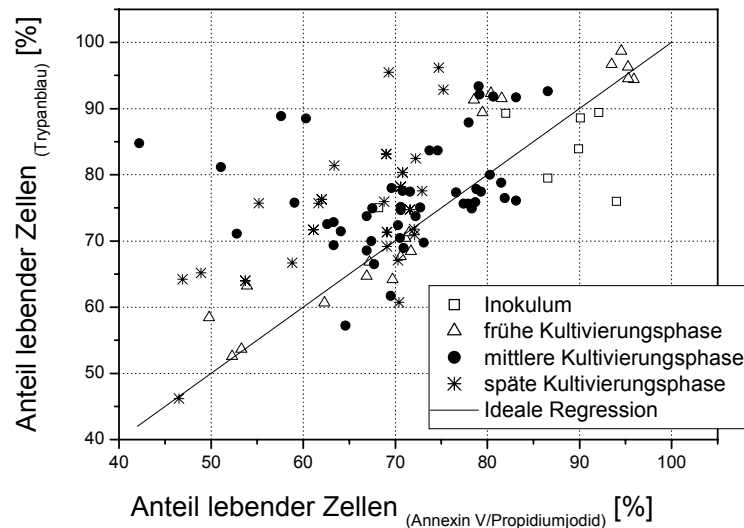


Abbildung 3.4: Korrelation des Anteils „lebender“ Zellen abgeleitet aus Trypanblau- und durchflusszytometrischer Annexin-V/Propidiumjodid-Färbung. Es wurden Daten aus 8 repräsentativen Experimenten verwendet. Die Grafik zeigt Ergebnisse der Vitalitätsbestimmungen unmittelbar nach dem Auftauen kryokonservierter Zellen, des Inokulums (0 h), früher Kultivierungsphase (24 bis 72 h), mittlerer Kultivierungsphase (96 bis 192 h) und später Kultivierungsphase (216 bis 360 h).

Hier zeigte sich ebenfalls sowohl für hohe als auch niedrige Vitalitäten eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit einer leichten aber signifikanten Überschätzung der Trypanblau-Methode ($+3,5 \pm 4,6\%$, $p=0,019$). Mit zunehmender Kulturdauer wurden mit der Trypanblau-Färbung relativ höhere Vitalitäten bestimmt (mittlere Kultivierungsphase: $+10 \pm 12,1\%$, ($p < 0,001$); späte Kultivierungsphase: $+14,6 \pm 13,1\%$, ($p < 0,001$). Mit fortschreitender Kultivierung und Erschöpfung von mitogenen Medienbestandteilen bzw. Akkumulation von toxischen Metaboliten kommt es zu einer Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen. Diese werden durch die Trypanblau-Methode aufgrund ihrer intakten Zellmembran nicht erfasst, folglich kommt es zu einer Überschätzung der Vitalität relativ zur Annexin-V-Färbung.

3.2.3 Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate

Ziel dieser Untersuchung war es ein Medium zu finden, welches die Expansion der Stamm- und Progenitorzellen unter den gewählten Kulturbedingungen optimal unterstützt. Zwei Kriterien wurden im Hinblick auf den Glukose- und

Laktatstoffwechsel als essenziell definiert: 1. Keine Glukose-Limitierung aufgrund zu geringer Ausgangskonzentration. Die Höhe der spezifischen Glukoseaufnahmerate kann einen Einfluss auf die Laktatsekretion ins Medium haben; 2. Vermeidung einer Inhibierung durch zu hohe Laktatkonzentrationen. Im Rahmen des Vergleichs der Medien sollen auch die spezifischen Glukoseaufnahme- und Laktatbildungsraten analysiert werden. Abbildung 3.5 A zeigt den normierten Glukosegehalt als Funktion der Zeit. Da die Medien unterschiedliche Konzentrationen an Glukose enthielten wurde der Verbrauch für die Darstellung auf den jeweiligen Ausgangswert eines Mediums normiert (siehe Tabelle 3.1). Im X-Vivo 15 war die höchste Konzentration nachzuweisen. Das StemSpan SFM, CellGro SCGM und Stempro-34 lagen im Bereich eines klassischen Mediums, dem IMDM (Iscoe's Modification of Dulbecco's Medium). Das IMDM weist in seiner ursprünglichen Formulierung $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ auf und wurde für eine Vielzahl von Zellkulturen eingesetzt (Freshney, 1987). In keinem der Medien wurde die Ausgangskonzentration der Glukose um mehr als die Hälfte reduziert.

Tabelle 3.1: Glukosekonzentrationen der untersuchten Basalmedien.

Medium	Glukosekonzentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
CellGro SCGM	4,2
AIM V	2,8
StemSpan SFM	4,2
X-Vivo 15	6,3
Stempro-34	4,2

Der zeitliche Verlauf des normierten Glukosegehalts ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Die zellspezifische Glukoseverbrauchsrate stieg in allen Medien von Anfangswerten zwischen 5 und $19 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}$ bis 144 h Kultur auf Werte bis $55 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}$ an. Patel und Mitarbeiter haben für humane hämatopoetische Batchkulturen mononukleärer Zellen konditionierter Leukämie-Patienten Werte für die spezifische Glukoseaufnahmerate von $20 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}$ gefunden (Patel et al., 2000). Im StemSpan SFM erreichten die Zellen die stärkste Proliferationsleistung mit der zweitniedrigsten spezifischen, d.h. auf die einzelne Zelle bezogenen, Glukoseaufnahmerate.

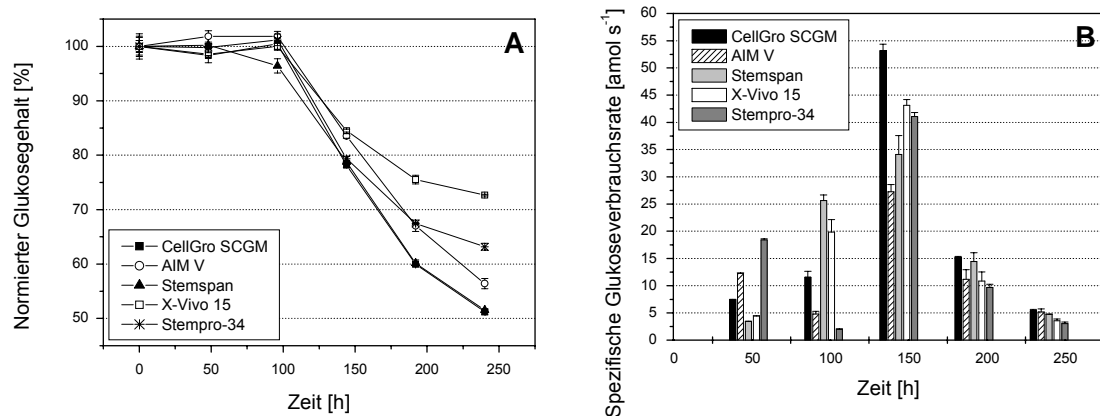


Abbildung 3.5: Einfluss des Basalmediums auf den normierten Glukosegehalt (A) und die spezifische Glukoseaufnahme (B). Die Glukoseaufnahme wurde auf die individuelle Ausgangskonzentration jedes Mediums zu 100% normiert.

Zwischen 192 und 240 h Kultur ging die spezifische Glukoseaufnahme auf das Niveau der Anfangswerte zurück. Zum gleichen Zeitpunkt traten die Kulturen in die stationäre Phase ein. In Abbildung 3.6 ist der zeitliche Verlauf der Laktatbildung und der spezifischen Laktatbildungsrate dargestellt. Alle Ansätze akkumulierten Laktatkonzentrationen nahe dem inhibierenden Bereich.

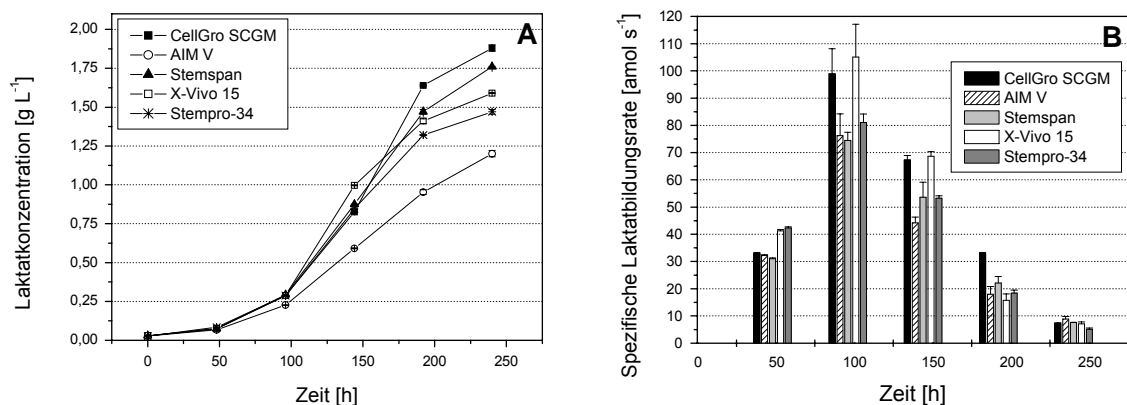


Abbildung 3.6: Einfluss des Basalmediums auf die Laktatbildung (A) und die spezifische Laktatbildungsrate (B).

Nach Patel und Mitarbeitern, die ausführliche metabolische Untersuchungen an hämatopoetischen Zellkulturen durchgeführt haben, ist von einer apparenten Laktatinhibierung erst ab einer Konzentration von 20 mmol·L⁻¹ bzw. 1,8 g·L⁻¹ in Kombination mit einer Ansäuerung des Kulturmediums in Bereiche bis pH 6,9 auszugehen. Die spezifischen Laktatbildungsraten zeigen ihre höchsten Werte

bereits nach 96 h. Danach nahmen die Werte kontinuierlich bis auf durchschnittlich $10 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}$ bis zum Ende der Kultivierung ab. Die Ansätze mit CellGro SCGM und X-Vivo 15 zeigten in der frühen Kultivierungsphase die stärkste Proliferation und damit auch die höchsten spezifischen Laktatbildungsraten mit 99 bzw. $106 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}$. Patel hat für humane hämatopoetische Batchkulturen mononukleärer Zellen von konditionierten Leukämie-Patienten eine spezifische Laktatbildungsrate von $40 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}$ gefunden. Die relativ zu den Ergebnissen Patels zum Teil zweifach erhöhten Werte, sowohl für die spezifische Glukoseaufnahmerate als auch Laktatbildungsrate, lassen sich durch die hohe Reinheit des Inokulums ($> 95\%$) und damit verbunden einem hohen Gehalt an proliferierenden CD34-positiven und damit erhöhter metabolischer Aktivität Zellen erklären. Collins und Mitarbeiter konnten 1998 ebenfalls zeigen, dass hämatopoetische Vorläuferzellen höhere spezifische Substrataufnahmeraten als differenziertere Zellstadien haben (Collins et al., 1998a). Das Verhältnis aus spezifischer Laktatbildungsrate zu spezifischer Sauerstoffaufnahmerate verwendete Collins zur Abschätzung des Gehaltes an frühen Vorläuferzellen. Die Abnahme der Substrataufnahme- und Metabolitproduktionsraten mit abnehmender CD34-Expression konnte auch im Rahmen der Bioreaktorkultivierungen demonstriert werden (siehe Abschnitt 3.10.2.7). Der mittlere apparente Laktat/Glukose-Ausbeutekoeffizient ($Y_{\text{Lak/Gluk}}$) lag für alle in dieser Arbeit durchgeführten primären Kulturen zwischen 96 und 240 Stunden Kultivierungszeit in einem Bereich von $1,62 \pm 0,18 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ und lag damit in einem für Säugetierzellen normalen Bereich. Miller und Mitarbeiter konnten für Hybridoma Zellen einen Laktat/Glukose-Ausbeutekoeffizienten von 1,4 bis $1,6 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ermitteln (Miller et al., 1987). Für die Produktionszelllinie BHK-21 berechneten Linz und Mitarbeiter 1997 einen $Y_{\text{Lak/Gluk}}$ -Wert von $1,6 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Linz et al. 1997).

3.2.4 Verbrauch einzelner Aminosäuren

Ziel dieser Untersuchung war die Identifizierung limitierender Aminosäuren. Es existieren keine umfassenden Untersuchungen zum Aminosäuremetabolismus primärer, hämatopoetischer Zellkulturen. Die Schwerpunkte der Medienentwicklung auf dem Gebiet der Zellkultur, die z. B. durch Guilbert und Iscove eingeleitet wurde (Guilbert und Iscove, 1976; Iscove et al., 1980), lagen hauptsächlich auf anderen Medienkomponenten wie: Serum (Paquette et al., 1998; Almeida-Porada et al., 2000;

Koller et al., 1998b), Wachstumsfaktoren (Kogler et al., 1998b), Proteine, Hormone und Lipide zur Serums substitution (Barnes und Sato, 1980) sowie Antioxidantien.

Die zeitliche Entwicklung der Konzentrationen der analysierten Aminosäuren hat sehr unterschiedliche Resultate für die eingesetzten Medien ergeben. Um eine bessere Auswertung zu gewährleisten, wurde eine Gruppierung der Aminosäuren (As) aufgrund folgender Kriterien durchgeführt: 1. Reduktion der Konzentration der As um mehr als 50%, 2. weniger als 50%, 3. Erhöhung der Konzentration der As aufgrund zellulärer Sekretion. Die dritte Gruppe, zu der nur L-Glutaminsäure und L-Alanin zugeordnet werden konnten, zeigte bis zum Ende der Kultivierung eine stetige Zunahme der Konzentration. Miller und Mitarbeiter konnten für Säugetierzelllinien (Hybridoma-Zellen) ebenfalls eine Sekretion nachweisen und demonstrierten, dass L-Alanin als Überflusmetabolit anzusehen ist (Miller et al., 1987).

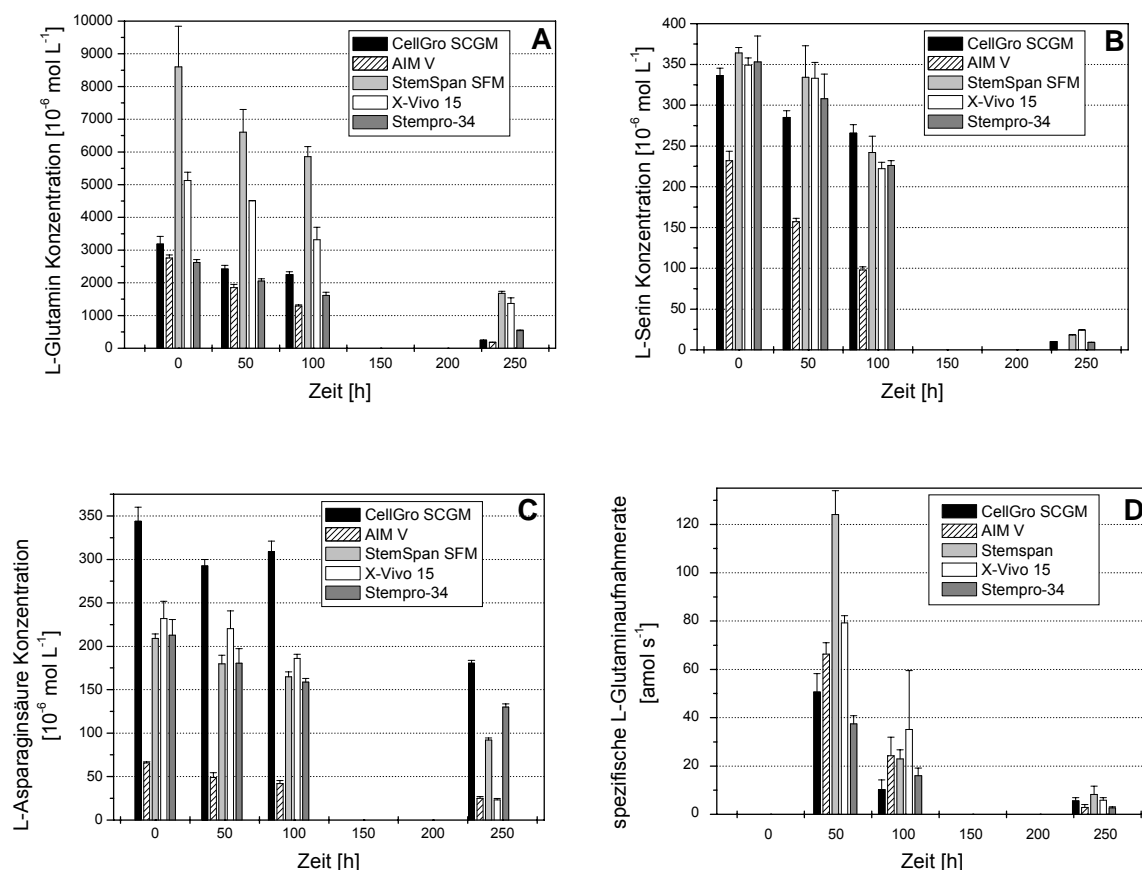


Abbildung 3.7: Verbrauch repräsentativer Aminosäuren als Funktion der Kulturzeit. L-Glutamin (A), L-Serin (B) und L-Asparaginsäure (C) gehören neben L-Asparagin, L-Arginin, L-Isoleucin und L-Leucin zu der Gruppe von Aminosäuren, deren Ausgangskonzentrationen zum Ende der Kultivierung um mehr als 50% reduziert wurden. (D) Zeitlicher Verlauf der spezifischen L-Glutamin-Aufnahmerate in Abhängigkeit des Basalmediums.

Linz zeigte mit der BHK-21 Zelllinie, dass L-Alanin sekretiert wird, solange keine Glukoselimitierung vorliegt (Linz et al., 1997). Auch Cruz und Mitarbeiter haben in Untersuchungen zum Metabolismus kontinuierlicher Kulturen von BHK21-Zellen zeigen können, dass L-Alanin bei hohen Glukosekonzentrationen aus Glukose über Pyruvat gebildet und sekretiert wird. Selbst L-Glutaminsäure, die als Vorstufe des L-Alanins angesehen wird, wurde sekretiert, was auf eine ausreichende Supplementierung aller fünf untersuchten Basalmedien sowohl mit Glukose als auch mit Glutamin hinwies (Cruz et al., 1999). Die zweite Gruppe umfasst die Aminosäuren, die eine Reduktion der Ausgangskonzentration um weniger als die Hälfte zeigten. Zu dieser Gruppe gehörten L-Threonin, L-Tyrosin, L-Valin, L-Tryptophan, L-Phenylalanin, L-Methionin, L-Lysin, Glycin und L-Histidin. Bei diesen Aminosäuren war nicht von einer limitierenden Wirkung auszugehen und ihre Konzentration wurde als suffizient angesehen. Zur ersten Gruppe gehörten Aminosäuren, deren Konzentrationen um mehr als die Hälfte, teilweise sogar bis auf Null, verringert waren. L-Asparaginsäure, L-Serin, L-Glutamin, L-Asparagin, L-Isoleucin, L-Leucin und L-Arginin konnten dieser Gruppe zugeordnet werden. Die zeitlichen Verläufe von L-Glutamin, L-Serin und L-Asparaginsäure sind in Abbildung 3.7 A bis C gezeigt. Diese drei Aminosäuren wurden in allen Kulturmedien am stärksten verbraucht. Die L-Glutaminkonzentration wurde im Mittel bis auf $16 \pm 7\%$ verringert. Im StemSpan SFM ging die L-Glutamin-Konzentration trotz der höchsten spezifischen Verbrauchsraten, jedoch aufgrund einer sehr hohen Anfangskonzentration von $8,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nur auf 20% des Ausgangsniveaus zurück. Vergleichend hierzu ist in Abbildung 3.7 D der zeitliche Verlauf der Glutaminaufnahmerate dargestellt. Die Werte für die spezifischen L-Glutaminaufnahmeraten nehmen im Verlauf der Kultivierung stetig ab. Im StemSpan SFM wurden innerhalb der ersten 48 h die höchste mittlere spezifische L-Glutaminaufnahmerate von $125 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1}$ gemessen. Während die zweithöchste Aufnahmerate im X-Vivo 15 ($80 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1}$) zu verzeichnen war, wurde die geringste Aufnahmerate im Stempro-34 mit $38 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1}$ nachgewiesen. Diese hohen und stark unterschiedlichen Verbrauchsraten könnten bei den konstanten Zellzahlen der Zellen in der Lag-Phase auf den Zerfall des thermoinstabilen L-Glutamins zurückgeführt werden. Nach 48 bis 96 h Kultur zeigten die Medienansätze dann eine gleichmäßigere Aufnahme von L-Glutamin. Es konnten spezifische L-Glutaminaufnahmeraten von $10 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1}$ (CellGro SCGM) bis $35 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1}$ (X-Vivo 15)

berechnet werden. Mercille und Mitarbeiter konnten für Hybridoma-Zellen in kontinuierlichen serumfreien Kulturen eine spezifische L-Glutaminaufnahmerate von $5 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}$ ermitteln (Mercille et al., 2000). Für CHO-Zellen in 125-mL-Spinnerkulturfleischbechern konnte Altamirano in serumfreiem und gering proteinhaltigen Medium einen L-Glutamin-Aufnahmerate von $18 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}$ bestimmen (Altamirano et al., 2000). Nach Cruz kann man davon ausgehen, dass L-Glutamin nicht limitierend sein kann, solange noch L-Glutaminsäure sekretiert wird (Cruz et al., 1999), was in für alle Kulturmedien zu jedem Zeitpunkt der Fall war. L-Serin wurde von allen Aminosäuren am stärksten verbraucht. Der Restgehalt lag im Mittel für alle Medien bei $4\pm 2\%$, damit im Bereich der Nachweisgrenze und einer vollständigen Aufnahme. Am drittstärksten wurde L-Asparaginsäure verbraucht. Im Mittel wurden Restkonzentrationen von $41\pm 8\%$ erreicht. Linz und Mitarbeiter haben ebenfalls gezeigt, dass in Abhängigkeit der Kulturbedingungen L-Serin, L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure bei Batchkulturen limitierend wirken können (Linz et al., 1997). L-Glutamin stellt die Hauptenergiequelle im Primärmetabolismus von Säugetierzelllinien dar. Durch die Glutaminolyse decken Säugetierzelllinien bis zu 65% ihres Energiehaushaltes, auch in Gegenwart von Glukose (Donnelly und Scheffler, 1976; Zielke et al., 1984).

Aus den Ergebnissen der Aminosäureanalytik wurde folgende Arbeitshypothese zur Verbesserung der Zusammensetzung abgeleitet:

- Eine Verdopplung der Ausgangskonzentration von L-Serin und L-Asparaginsäure beeinflusst das Wachstum der Zellen positiv. Eine Wirkung auf die Differenzierung muss parallel untersucht werden.

Diese Hypothese wird in Abschnitt 3.3 behandelt.

3.2.5 Differenzierung von Vorläuferzellen

Weiterhin wurde der Einfluss der Medien auf die Zelldifferenzierung untersucht. Als entscheidend wurde hierbei die Expansion von frühen und intermediären Vorläuferzellen angesehen. Dafür wurde sowohl die phänotypische Charakterisierung der CD34-Expression der Zellen mittels Durchflusszytometrie eingesetzt, als auch eine funktionelle Charakterisierung der Zellen zur Verifizierung ihres proliferativen Potentials herangezogen. Zur Analyse von reiferen erythrozytären, monozytären, granulozytären, megakaryozytären und multilinearen

Vorläuferzellen wurden Kurzzeit-Methylzellulose-Kulturen durchgeführt. Zum Nachweis von frühen Vorläuferzellen diente die Langzeit-Kultur von Cobblestone-Area Forming Cells (CAFC). Ziel war es, dasjenige Medium zu identifizieren, welches eine Expansion der oben angesprochenen Zelltypen am Besten unterstützt, da insbesondere der Gehalt unreifer CAFC als essenziell für den nachhaltigen Erfolg eines hämatopoetischen Transplantats angesehen wird (Ploemacher, 1997).

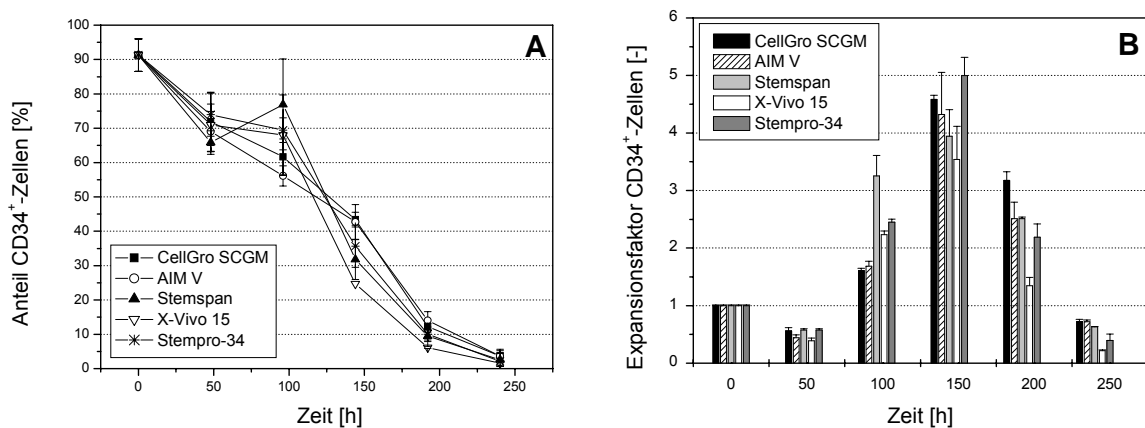


Abbildung 3.8: Einfluss des Basalmediums auf den zeitlichen Verlauf der CD34-Expression (A) und des Expansionsfaktors CD34-exprimierender Zellen (B).

In Abbildung 3.8 sind der zeitliche Verlauf des CD34-Anteils der Zellen und der Expansionsfaktor CD34-exprimierender Zellen dargestellt. Ausgehend vom Inokulum nahm die CD34-Expression bis zum Ende der Kultur nach 240 h kontinuierlich ab.

Der stetige Verlust CD34⁺-exprimierender Zellen zeigte nach 96 h eine Verlangsamung. Dies kann durch das Ende der Lag-Phase und der damit verstärkt einsetzenden Proliferation von Vorläuferzellen erklärt werden. Die Analyse des zeitlichen Verlaufs des Expansionsfaktors CD34⁺-Zellen soll die beiden Vorgänge Proliferation und Differenzierung verbinden. Ausgehend von dem Gehalt CD34⁺-Zellen im Inokulum kam es durch den Auftauvorgang zu einer Schädigung der Zellen und einem Verlust von vitalen Zellen. Aufgrund der einsetzenden Proliferation kam es danach bis 144 h Kultur zu einer Zunahme der Zahl CD34⁺-Zellen mit maximalen Expansionsfaktoren von 3,5- bis 5-fach (X-Vivo 15 bzw. Stempro34). Das Ergebnis im StemSpan SFM (4-fach) lag unter dem CellGro SCGM ($p=0,17$) und dem Stempro-34 ($p=0,08$). Im weiteren Verlauf der Kultur kam es durch die fortschreitende Differenzierung bei gleichzeitig sich stetig verlangsamer Proliferation zu einem kontinuierlichen Verlust an CD34⁺-Zellen. Am Ende der Kultur

waren schließlich in allen Ansätzen weniger CD34⁺-Zellen als zu Beginn nachzuweisen.

Relevante Information über das biologische Potential hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen erhält man über den CFU-Assay. Die zeitlichen Verläufe der verschiedenen analysierten Progenitoren und des CAFC-Assays sind in Abb. 3.9 A-F zusammengefasst. Die Ergebnisse der erythrozytären Progenitoren (Abbildung 3.9 A) zeigten nach 144 bis 192 h Kultur für alle Ansätze die maximale Expansion. Der höchste Wert wurde nach 144 h Kultur mit Stempro-34 (26-fach, $p=n.s.$) erreicht. Am letzten Tag der Kultur konnte eine zwei- (X-Vivo 15) bis achtfache (AIM V) Expansion der CFU-/BFU-E des Inokulums nachgewiesen werden. Die Expansionsfaktoren der granulozytären Progenitoren wiesen ebenfalls ihre Maxima zwischen 144 und 192 h auf. Der Maximalwert wurde im Ansatz mit Stempro-34 (11-fach) erreicht. Im StemSpan SFM erreichten die Zellen eine Expansion von 5,9-fach ($p=0,095$). Zum Ende der Kultivierung sanken die CFU-G-Zellzahlen auf das Niveau des Inokulums.

Die relativ schwächste Expansionsleistung zeigte StemSpan SFM mit 5-fach bei der Proliferation monozytärer Vorläufer. Das beste Medium (CellGro SCGM) erreichte zu diesem Zeitpunkt einen Expansionsfaktor von 10,1 ($p=0,22$). Auch Stempro-34 (10-fach, $p=0,17$) und X-Vivo 15 (8-fach) zeigten bessere Ergebnisse, auch wenn aufgrund der relativ geringeren Frequenz der monozytären Vorläuferzellen keines signifikant war. Die Ergebnisse der Untersuchungen der multilinearen Vorläufer konnten aufgrund der niedrigen Frequenz dieser Zellen innerhalb der CD34⁺-Population ebenfalls allenfalls Hinweise auf zeitliche Veränderungen liefern. Die besten Ergebnisse wurden nach 144 h Kultur mit StemSpan SFM (32-fach) erreicht. Die megakaryozytären Vorläufer zeigten im zeitlichen Verlauf eine um 48 h verzögerte Entwicklung. Die maximalen Werte wurden hier nach 192 bis 240 h erreicht. StemSpan SFM zeigte an beiden Tagen die relativ stärkste Expansion von 50-fach bzw. 67-fach. Betreffend Cobblestone-Area Forming Cells (CAFC) offenbarte der zeitliche Verlauf deutliche Vorteile für StemSpan SFM. Alle Ansätze zeigten nach 144 h der Kultivierung die maximale Expansion. In StemSpan SFM konnte zu diesem Zeitpunkt der höchste Expansionsfaktor mit über 11 erreicht werden. Nach 96 und 240 h Kultur konnten in den Ansätzen mit StemSpan SFM über 93% mehr CAFC als in den anderen Medien nachgewiesen werden. Nach 192 h war der Vorteil gegenüber den anderen Medien signifikant ($0,016 < p < 0,032$). Die Ergebnisse der

Analyse der CFU- und CAFC-Assays lassen aufgrund der oft fehlenden statistischen Signifikanz in den meisten Fällen keine eindeutigen Aussagen zu.

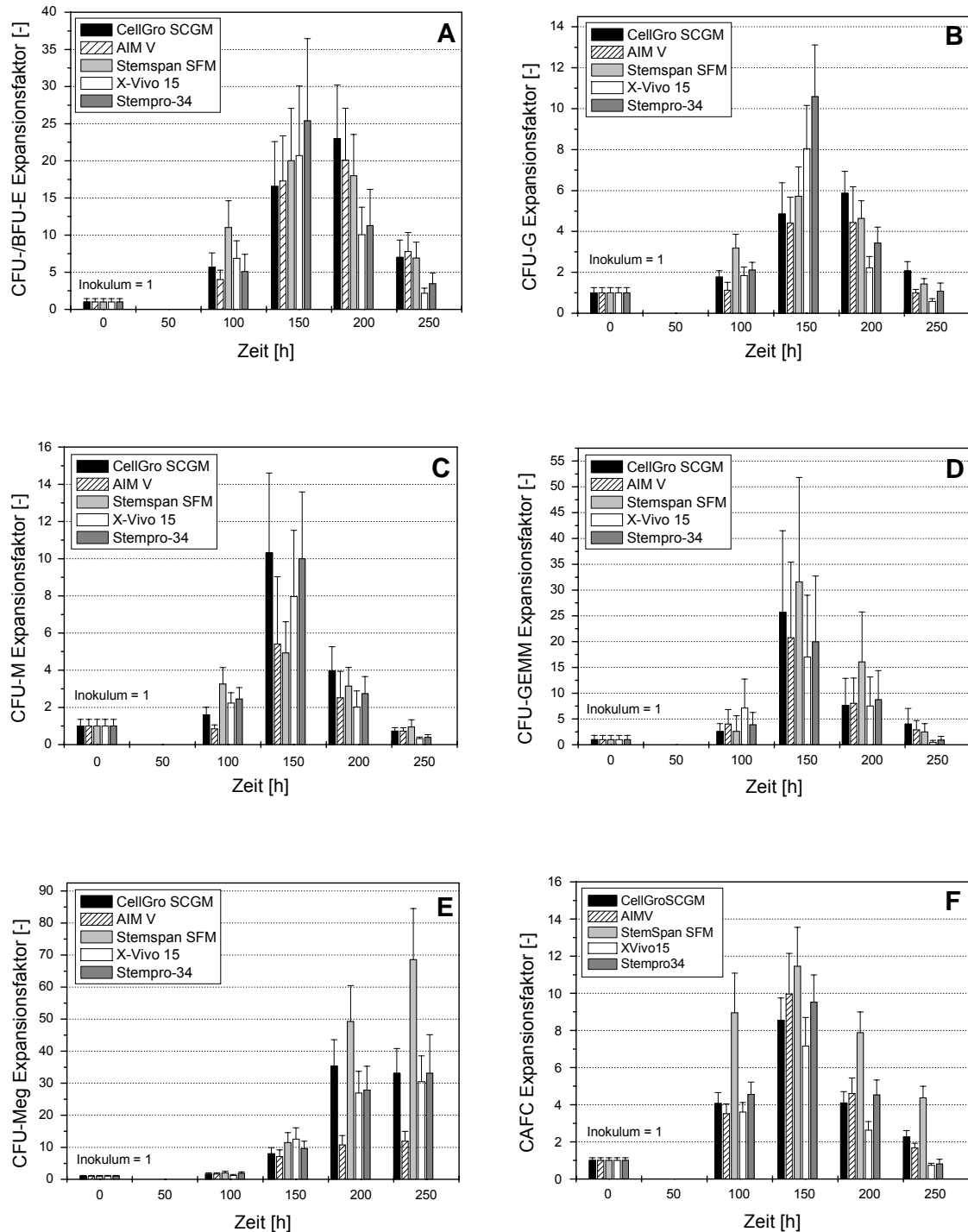


Abbildung 3.9: Einfluss des Basalmediums auf den Expansionsfaktor von erythrozytären Progenitoren (CFU-BFU-E, A), granulozytären Progenitoren (CFU-G, B), monozytären Progenitoren (CFU-M, C), multilinearen Progenitoren (CFU-GEMM, D), megakaryozytären Progenitoren (CFU-Meg, E) und frühen Stammzellen, den Cobblestone-Area Forming Cells (CAFC, F).

Während StemPro-34 für die CFU-/BFU-E, CFU-G und CFU-M die besten Resultate erahnen ließ, schien StemSpan SFM für die Expansion von CFU-Meg und den multilinearen CFU-GEMM Vorteile aufzuweisen. Van den Oudenrijn und Mitarbeiter haben 2001 ebenfalls zeigen können, dass StemSpan SFM dem CellGro SCGM hinsichtlich Expansion megakaryozytärer Vorläuferzellen unter verschiedenen Bedingungen überlegen ist (Van den Oudenrijn et al., 2001). Zusammen mit den Ergebnissen für die Cobblestone-Area Forming Cells wurde ein deutlicher Vorteil für StemSpan SFM erkannt. Aufgrund der erhobenen Daten wurde die Entscheidung getroffen, alle folgenden Experimente mit humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ausschließlich auf der Basis von StemSpan SFM durchzuführen.

3.3 *Gezielte Supplementierung mit L-Serin und L-Asparaginsäure*

Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, ob die Arbeitshypothese aus Abschnitt 3.2.4 bestätigt werden kann. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene parallele Kulturansätze miteinander verglichen. Der Ansatz 1 bestand nur aus dem Grundmedium mit $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ Flt-3 Ligand und $300 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ IL-1 β . Den anderen Ansätzen (2 und 3) wurden folgende weitere Wachstumsfaktoren zugesetzt: $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ SCF und $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ IL-3. Das Grundmedium bestand aus StemSpan SFM, 3% humanem AB-Serum, $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-Glutamin, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hydrocortison, $50 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Penicillin und $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Streptomycin. In Ansatz 3 wurden weiterhin die Konzentrationen von L-Asparaginsäure (L-Asp) und L-Serin (L-Ser) auf 420 bzw. 730 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ verdoppelt. Das Inokulum bestand in allen durchgeführten Experimenten aus $3,5\cdot 10^5$ Zellen mL^{-1} mit einem Gehalt von 25%CD34⁺-Zellen. Die Zellen wurden aus kryokonservierten Leukapheresaten selektiert. Der Verlauf der Gesamtzellexpansion ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Innerhalb der ersten 72 h wurde die Gesamtzellzahl nahezu konstant gehalten. Die Lag-Phase ist gerade bei niedrigeren Reinheiten CD34⁺-Zellen im Inokulum deutlich zu erkennen. Die meisten reifen Zellpopulationen, wie z. B. neutrophile Granulozyten werden beim Auftauvorgang irreparabel geschädigt. Ansatz 1 zeigte relativ zu den anderen beiden ein geringes Wachstum (144 h: 4-fach; 312 h: 8-fach, $p_{1-3}=0,029$). Ein Vergleich der beiden mit allen Wachstumsfaktoren supplementierten Ansätze 2 und 3 ergab nach 144 h Kultur eine erkennbar bessere, jedoch nicht signifikante, Expansionsrate der

Zellen in Ansatz 3. Ansatz 2 erreichte die maximale Expansion nach 144 h Kultur mit 15-fach und sank im weiteren Verlauf bis zum Ende der Kultur leicht ab (11-fach).

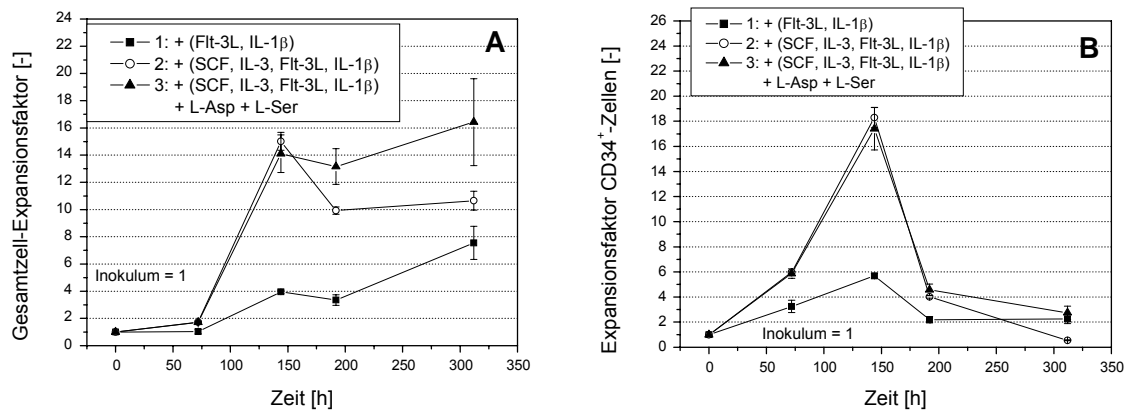


Abbildung 3.10: Einfluss der Verdopplung der L-Asparaginsäure- und L-Serin-Konzentration auf den zeitlichen Verlauf der Expansion aller Zellen (A) und der CD34⁺-Zellen (B). In Ansatz 3 wurden die L-Asp und L-Ser-Konzentration verdoppelt. Der Kontrollansatz 1 wurde ohne SCF und IL-3 nur mit Flt-3 Ligand (Flt-3L) und IL-1 β kultiviert.

Ansatz 3, der nach 144 h ebenfalls eine 15-fache Gesamtzellexpansion aufwies, konnte das Niveau halten (312 h: 16 \pm 4-fach, $p_{2-3}=0,085$). Der Vorteil der Verdopplung von L-Asp und L-Ser in Ansatz 3 gegenüber 2 wurde bei Analyse der CD34⁺-Zellen erst am letzten Kulturtag deutlich. Die zeitliche Änderung der CD34-Zell-Expansion ist in Abbildung 3.10 B gezeigt. Die maximale Expansion von 6-fach im Ansatz 1 wurde nach 144 h erreicht. In den beiden Ansätzen mit SCF und IL-3 war eine maximale Expansion ebenfalls nach 144 h mit 17,5-fach zu verzeichnen. Anschließend sank die Anzahl CD34⁺-Zellen aufgrund der fortschreitenden Differenzierung ab. Nach 312 h verringerte sich schließlich die Zahl CD34⁺-Zellen in Ansatz 2 unter das Ausgangsniveau auf 0,6 \pm 0,1-fach, während im Ansatz 3 eine Expansion von 3 \pm 0,3-fach erhalten blieb ($p_{2-3}=0,0095$). Interessanterweise verblieb auch der Gehalt in Ansatz 1 auf diesem Niveau und lag am Ende der Kultur bei 2,1-fach, auch wenn die Expansionsfaktoren über den gesamten Kulturverlauf hinweg signifikant unter denen der anderen Ansätzen lagen. Als weiterer Parameter wurde der Einfluss auf die zeitliche Entwicklung der Vorläuferzellen untersucht. In Abbildung 3.11 ist der Verlauf erythrozytärer (A) und granulozytär-monozytärer (B) Vorläuferzellen dargestellt. Während die Abwesenheit von SCF und IL-3 in Ansatz 1 eindeutig zu einer Reduktion des Wachstums beider Differenzierungsreihen führte, gab es keinen erkennbaren Unterschied zwischen Ansatz 2 und 3 bezüglich der

erythrozytären Vorläufer. Die Maxima von 27 ± 9 -fach und 26 ± 9 -fach, für Ansatz 2 bzw. 3, wurden nach 144 h bestimmt und das Ergebnis sank danach nach 192 h in einen Bereich einer 17-fachen Vermehrung für beide Ansätze ab.

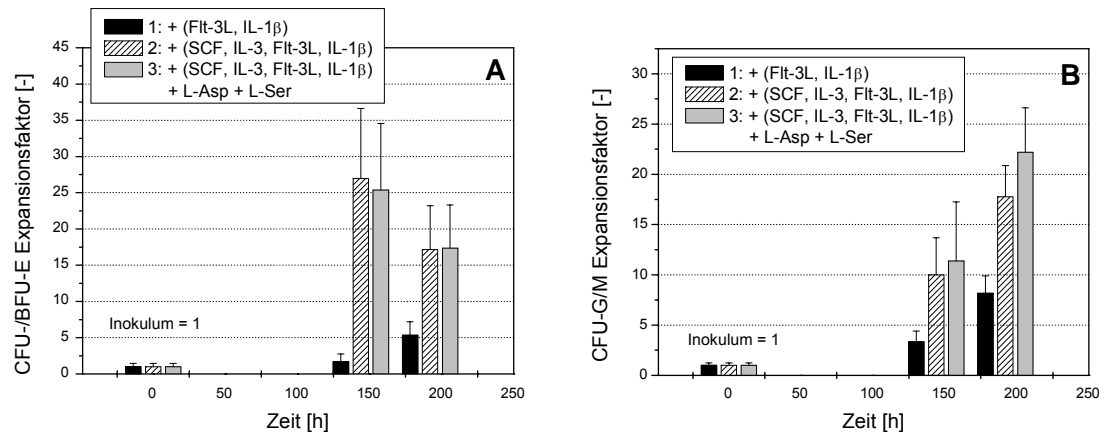


Abbildung 3.11: Einfluss der Verdopplung der L-Asparaginsäure- und L-Serin-Konzentration auf den zeitlichen Verlauf der Expansion der erythrozytären (CFU-/BFU-E, A) und granulozytär-monozytären (CFU-G/M, B) Vorläuferzellen.

Die Analyse der granulozytär-monozytären Vorläufer ergab nach 192 h Kultur eine tendenziell stärkere Expansion für Ansatz 3, die jedoch keine Signifikanz erreichte ($p=0,35$). Der zeitliche Verlauf der L-Asparaginsäure-, L-Serin- und L-Glutamin-Konzentration ist in Abbildung 3.12 gezeigt. Für L-Asparaginsäure konnte eindeutig gezeigt werden, dass sie ohne eine Verdopplung der Ausgangskonzentration vollständig verbraucht wird. Die Analyse der L-Serin-Konzentration ergab für keinen der Ansätze eine komplette Erschöpfung. Im Ansatz 1 verbleiben nach 312 h Kultur $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, während Ansatz 2 eine Residualkonzentration von $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und Ansatz 3 von $42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aufwies. L-Glutamin wies am Ende der Kultur in allen drei Ansätzen eine Konzentration von größer $2,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf, weshalb eine Limitierung des Wachstums durch L-Glutaminmangel ausgeschlossen werden kann. Es konnte demonstriert werden, dass durch die Verdopplung keine negativen Auswirkungen auf das untersuchte zelluläre System (Startzellkonzentration und Startzellzusammensetzung) im Sinne einer Substratinhibierung auftraten. Auch wenn sich die Normalwerte im Blutplasma für L-Serin im Bereich von 75 bis $170 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Volk und Neumann, 2001), für L-Asparaginsäure von 0 bis $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und für L-Glutamin zwischen 400 und $700 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ bewegen (Boza et al., 2000), konnte durch die Aminosäuresupplementierung eine größere Gesamtzellexpansion erreicht

werden. Zusätzlich wurden Hinweise auf ein besseres Wachstum der CFU-GM gefunden.

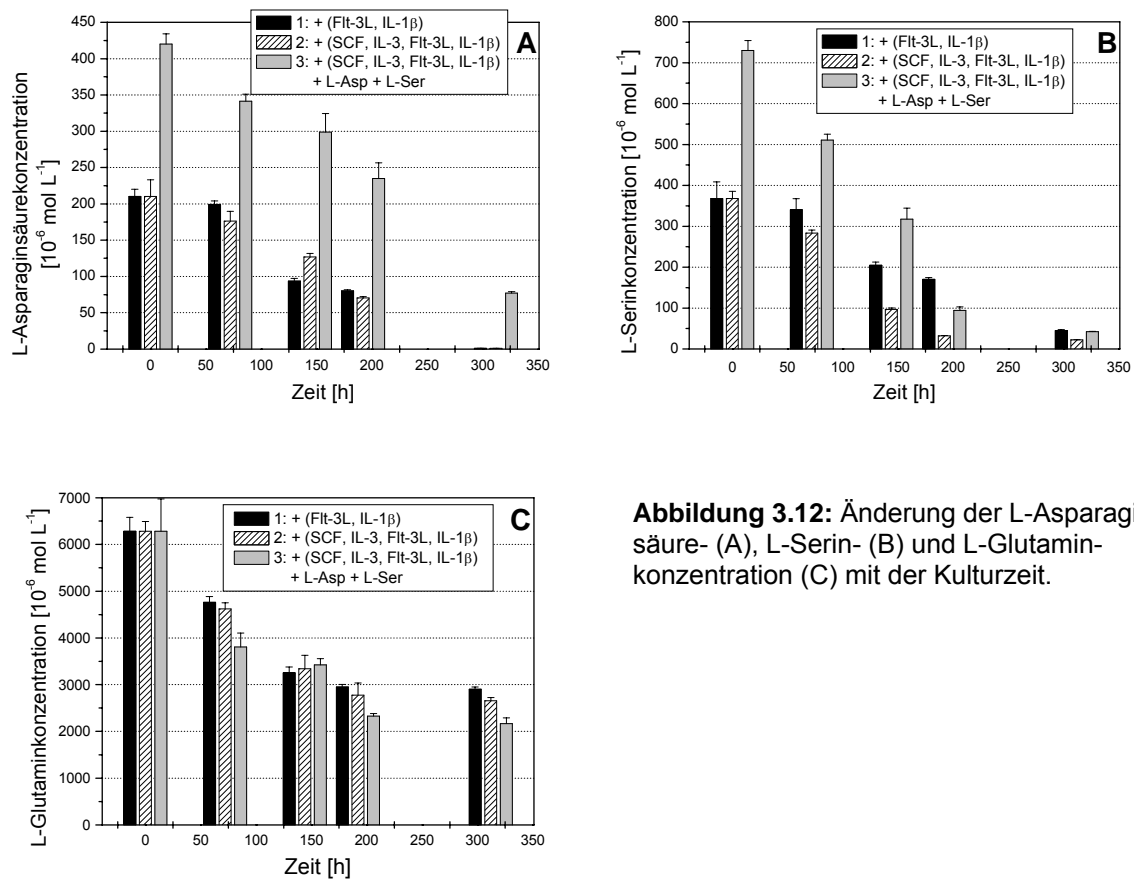


Abbildung 3.12: Änderung der L-Asparaginsäure- (A), L-Serin- (B) und L-Glutamin-konzentration (C) mit der Kulturzeit.

Durch die Analyse der Vergleichskultur konnte L-Asparaginsäure eindeutig als limitierender Faktor in den untersuchten, kommerziellerhältlichen Kulturmedien identifiziert werden. Für beide Aminosäuren sollte an eine Erhöhung der Konzentration gerade bei Kulturen mit hohen Zellkonzentrationen gedacht werden. Eine L-Glutaminausgangskonzentration im Bereich von 5.000 bis $6.000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ erschien zusammen mit den Erkenntnissen aus der Untersuchung der Basalmedien als optimal. Für alle weiteren Experimente, bei denen StemSpan SFM zum Einsatz kam, wurden die Konzentrationen der untersuchten Aminosäuren L-Asparaginsäure und L-Serin auf die doppelte Konzentration eingestellt (420 bzw. $730 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) und L-Glutamin bei $8.000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ belassen.

3.4 Wachstumsfaktoren für die Proliferation von CD34⁺-Zellen

Neben der Auswahl des Basalmediums ist die Zugabe von geeigneten Wachstumsfaktoren absolut kritisch für die Optimierung der Kultur hämatopoetischer Zellen. Ziel dieser Untersuchung war die Identifizierung von Wachstumsfaktoren, die einen mitogenen Effekt auf die für diese Arbeit zur Verfügung stehenden peripheren Blutstammzellen haben. Dazu wurden einige der in der Literatur häufig beschriebenen Wachstumsfaktoren im Rahmen eines Multiwell-Mitogenassays untersucht, der mit Zellzahl und Vitalität der Zellen korrelierbar ist.

Die Kulturen wurden in 96-Loch-Platten mit einem Kulturvolumen von 120 µL durchgeführt und mit einer Startzellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ CD34⁺-Zellen mL⁻¹ inokuliert. Der Anteil der CD34⁺-Zellpopulation im Inokulum betrug > 95%. Dem Grundmedium wurde neben humanem AB-Serum (4%), 50 U·mL⁻¹ Penicillin, 50 µg·mL⁻¹ Streptomycin, 1 µmol·L⁻¹ Hydrocortison in allen Ansätzen 50 ng·mL⁻¹ SCF zugesetzt. Zur vergleichenden Analyse wurden die in der Legende zu Abbildung 3.13 aufgeführten Wachstumsfaktoren in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Diese Konzentrationen entsprechen den in der Literatur angegebenen Bereichen für eine maximale Stimulation (Borge et al., 1997; Zandstra et al., 1997).

Alle Ansätze außer dem mit bFGF zeigen relativ zum Kontrollansatz einen signifikanten, stimulierenden Effekt. Yeoh und Mitarbeiter hingegen konnten für murine C57BL/6 SJL CD45.1-Knochenmarkzellen zeigen, dass FGF-2 (bFGF) in Kombination mit SCF, IL-11 und Flt-3 Ligand die Zellexpansion signifikant positiv beeinflusst (Yeoh et al., 2006). Von den aufgeführten bifaktoriellen Ansätzen zeigten die Kombinationen von SCF mit IL-3 bzw. EPO den stärksten Effekt mit einer Erhöhung der WST-1-Aktivität um den Faktor 1,6 bzw. 1,5. Um einen Eindruck von der maximalen Stimulation der Zellen zu bekommen, wurden im letzten Ansatz alle Wachstumsfaktoren mit den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Die mit dem WST-1-Test ermittelte Aktivität der Zellen ergab eine Erhöhung um den Faktor 4,3 gegenüber der Kontrolle. Die Übersicht zu Wachstumsfaktoren für die *in vitro* Expansion hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen (Tabelle 1.2 in Abschnitt 1.4.4.1.) bestätigt SCF und IL-3 als die essenziellen der die Proliferation stimulierenden Faktoren.

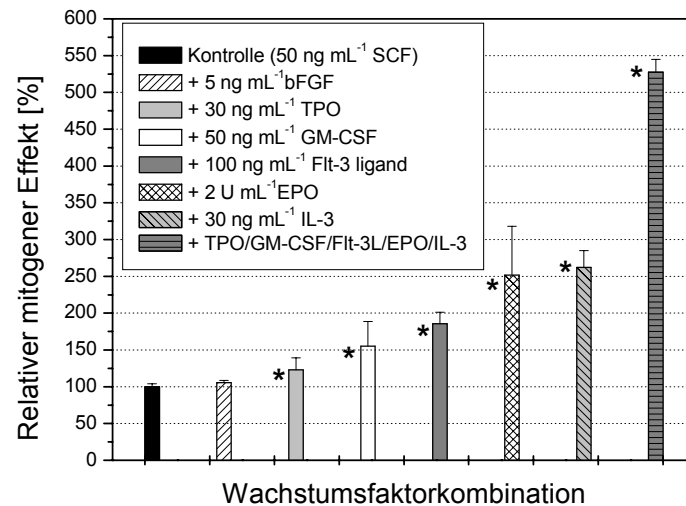


Abbildung 3.13: Mit dem WST-1-Test gemessener Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Proliferation und Vitalität isolierter peripherer CD34⁺-Blutstammzellen. Den verschiedenen Kombinationen wurde standardmäßig SCF mit einer Konzentration von 50 ng·mL⁻¹ zugesetzt. Der nur mit SCF supplementierte Kontrollansatz wurde als 100% Stimulation definiert. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit „*“ gekennzeichnet (p<0,05, Student t-Test für unverbundene Stichproben).

De Haan und Mitarbeiter haben grundlegende Zusammenhänge über das mögliche Zusammenwirken von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren diskutiert. Sie konnten auf der Basis von Mausmodellen zeigen, dass es synergistisch, redundant und pleiotroph wirkende Wachstumsfaktorkombinationen gibt (De Haan et al., 1996). Dies erklärt, warum beim Einsatz von 5 oder mehr Wachstumsfaktoren die stimulatorische Wirkung der einzelnen nicht einfach addiert und die resultierende Aktivität somit nicht vorhergesagt werden kann. Auf der anderen Seite konnten von verschiedenen Autoren (Lam et al., 2001; Gammaitoni et al., 2003; Kogler et al., 1998a;b) die Vorteile einer umfangreichen und komplex aufgebauten Wachstumsfaktorkombination gezeigt werden. Daneben haben De Bruyn et al. mit CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut eindeutig zeigen können, dass eine umfangreiche Zytokinkombination (5 Faktoren) allen durch ihn untersuchten Zweier-, Dreier- und Vierer-Kombination aus einer Gruppe bestehend aus SCF, IL-3, G-CSF, Flt3 Ligand und Thrombopoetin in puncto Gesamtzell- und CD34⁺-Zellexpansion überlegen ist (De Bruyn et al., 2003). Yao und Mitarbeiter ermittelten sogar eine Kombination bestehend aus TPO, IL-3, SCF, FL, IL-6, G-CSF, GM-CSF, SCGF und IL-11 als optimal (Yao et al., 2004). Diese Resultate unterstützen die eigenen Ergebnisse aus der Untersuchung einer umfangreichen Zytokinkombination aus SCF, IL-3, GM-CSF, Flt-3 Ligand, Erythropoetin und Thrombopoetin relativ zu Zweierkombination aller

aufgeführten Zytokine mit Zusatz von SCF. Die Ergebnisse eines Vorversuchs zeigten, dass die stimulierende Wirkung der Kombination aus SCF und IL-3 hinsichtlich Proliferation allen anderen überlegen ist. Motiviert durch die Vorergebnisse mit den peripheren Blutstammzellen und bestätigt durch Literaturstellen wurde die Entscheidung getroffen SCF und IL-3 in Eigenproduktion herzustellen, um für die weiteren Versuchsansätze ausreichende Mengen an Wachstumsfaktoren zur Verfügung zu haben. Da die Zellen auch in kontinuierlichen Bioreaktorsystemen zum Einsatz kommen sollten, kam die Motivation aus der zu erwartenden Kostenreduktion. Es wurde die Entscheidung getroffen humanes SCF und IL-3 auf der Basis des Baculovirus-Expressionssystems selbst herzustellen, da bei der Herstellung der rekombinanten Baculoviren sowie bei der Erarbeitung der grundlegenden Aufreinigungsstrategie auf umfangreiche Vorarbeiten zurückgegriffen werden konnte. Das Know-how der Kultivierung von Insektenzellen bis in den 2 Liter Maßstab war in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik vorhanden.

3.5 *Produktion rekombinanter Wachstumsfaktoren*

Motiviert durch die Vorergebnisse mit den peripheren Blutstammzellen und bestätigt durch Literaturstellen wurde die Entscheidung getroffen SCF und IL-3 in größeren Mengen in Eigenproduktion herzustellen. Die Voraussetzungen für eine eigene Produktion wurden in Kooperation mit Dr. Hongbiao Ding aus der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik und Dr. Herbert Weich, Abteilung Genregulation und Gendifferenzierung, geschaffen. Dazu mussten beide Gene kloniert und rekombinante Baculoviren generiert werden, die dann zur Proteinproduktion durch die Infektion von High Five Insektenzellen genutzt werden sollten.

3.5.1 Produktion und Reinigung von humanem SCF und Interleukin-3

Ziel dieses Arbeitsabschnitts war die Expression und Aufreinigung von rekombinantem humanem Stammzell-Faktor und Interleukin-3 zum direkten Einsatz in Kulturen peripherer Blutstammzellen. Die Herstellung der rekombinanten Baculoviren sowie die Erarbeitung der grundlegenden Aufreinigungsstrategie sind auf umfangreiche Vorarbeiten zurückzuführen. Die praktischen Anteile wurden von

Dr. Hongbiao Ding im Labor von Dr. Herbert Weich durchgeführt. Die theoretische Vorbereitung fand in enger Kooperation mit dem Projektleiter Dr. Volker Jäger, Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik statt.

Für die vorliegende Arbeit wurden Kultivierungen in 2,5-Liter Bioreaktoren durchgeführt, um die gewünschten Proteine in der Größenordnung von 1 g exprimieren zu können. Die Wachstumsfaktoren sollten anschließend aus den Kulturüberständen aufgereinigt und ihre spezifische biologische Aktivität ermittelt werden. Die Aktivität sollte vergleichend zu kommerziell erhältlichen, bakteriell-exprimierten Proteinen auf der Basis von Zytokin-abhängigen Leukämiezelllinien, als auch über die Kultivierung humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen untersucht werden.

3.5.2 Produktion im Bioreaktormaßstab

Für die Produktion der Proteine wurde ein 2,5-Liter Glasbioreaktor, wie in Abschnitt 2.9.2 beschrieben, eingesetzt (Chico und Jäger, 2000). Zur Produktion wurde die BTI-Tn5B1-4 (High Five) Zelllinie eingesetzt. IL-3 wurde zusätzlich in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Zellen exprimiert (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Produktion von konditionierten Insektenzell-Überständen in einem 2,5 Liter GBF-Bioreaktor mit Hohlfasermembran-Taumelrührer.

Kulturüberstand Nr.	Protein	geerntetes Volumen [Liter]	Produktions-Zelllinie	Medium
1	Interleukin-3	2,2	SF9	TEX/Asn
2	SCF	2,1	High Five	Insect Express
3	Interleukin-3	2,3	High Five	TEX/Asn

Der Kulturüberstand wurde 3 Tage nach Infektion mit den rekombinanten Baculoviren durch einen Zentrifugationsschritt geerntet und bei -20° C bis zur Aufreinigung gelagert.

3.5.3 Aufreinigung der Wachstumsfaktoren

Die konditionierten Überstände wurden aufgetaut und über Nacht gegen einen Imidazol-haltigen Puffer dialysiert. Im Anschluss an den Dialyseschritt wurden 500 bis 800 mL Dialysat mit einer Flussrate von 2,5 bis 3,5 mL min⁻¹ einmalig über die konditionierte Co²⁺-Chelat-Säule gepumpt. Die fraktionierte Elution wurde wie in Abschnitt 2.9.3 beschrieben durchgeführt. 6-mal 2 mL Elutionspuffer wurden auf die Säule gegeben, separat aufgefangen und analysiert. Jede der sechs Fraktionen von ca. 2 mL Volumen wurde einem Proteintest unterzogen. Ziel dieser Untersuchung war die Information in welcher Fraktion das Zielprotein von der Säule eluiert wurde. Die Ergebnisse von 7 Aufreinigungen sind in Abbildung 3.14 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass im Mittel über 80% des in der Co²⁺-Chelat-Säule gebundenen Proteins in Fraktion 2 und 3 gewonnen werden konnten (Fraktion 2 (F2): 50±16%, F3: 31±10%). Mittels gelelektrophoretischer Methoden (SDS-PAGE), Western Blotting, Proteinsequenzierung und spezifischen Aktivitätstests sollte im folgendem verifiziert werden, dass es sich um das vollständig exprimierte, rekombinante Proteine in hoher Reinheit und mit hoher spezifischer Aktivität handelte.

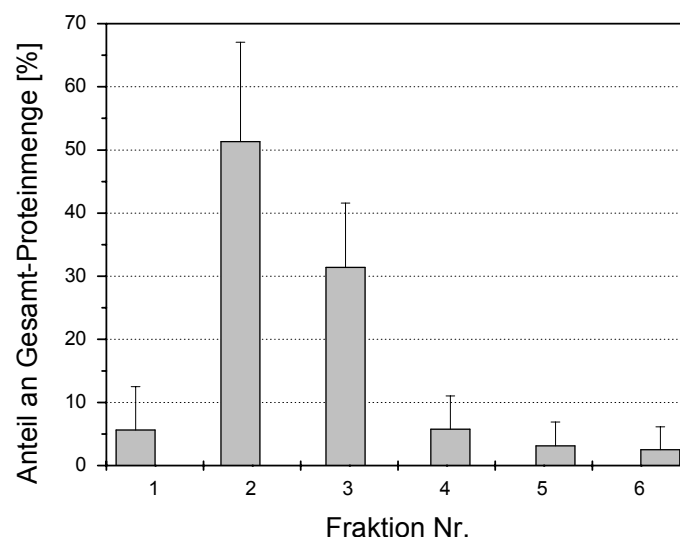


Abbildung 3.14: Prozentualer Anteil der Fraktionen 1 bis 6 an der Gesamtmenge des mittels Imidazol-Puffer von der Co²⁺-Chelat-Säule eluierten Proteins (n=7; Kulturüberstände 1 bis 3). Ergebnisse eines BCA-Assays mit Albumin-Standard.

3.5.4 Qualitätskontrolle der aufgereinigten Wachstumsfaktoren

3.5.4.1 SDS-PAGE- und Western-Blotting-Analyse des humanen IL-3

Das humane IL-3 wurde in voller Länge und in löslicher Form exprimiert und ist in hoher Reinheit nachweisbar (geschätzt anhand SDS-PAGE: > 95%). Das Produkt konnte im konditionierten Überstand, dem Startmaterial und in den Elutionsfraktionen spezifisch nachgewiesen werden. Das rekombinante IL-3 wies ein apparentes Molekulargewicht von 15 bis 21,5 kDa auf, was gleich bzw. größer ist als das reine Peptid (15 kDa, 133 Aminosäuren, ExPASy (Expert Protein Analysis System)-Swiss-Prot, Protein Knowledgebase, <http://au.expasy.org/sprot/>). Der Größenunterschied ist auf die lepidopterentypische, paucimannosidische Glykosylierung an beiden N-Glykosylierungsstellen des Proteins zurückzuführen (Ding et al., 2003). Die SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 3.15 A) zeigte alle drei theoretisch auftretenden Hauptformen des Proteins, die un-, mono- und diglykosylierte Form mit zunehmendem Molekulargewicht in aufsteigender Reihenfolge. Die molekulare Identität des Proteins wurde zusätzlich über Western-Blotting mit einem spezifischen anti-IL-3 Antikörper durchgeführt (Abbildung 3.15 B).

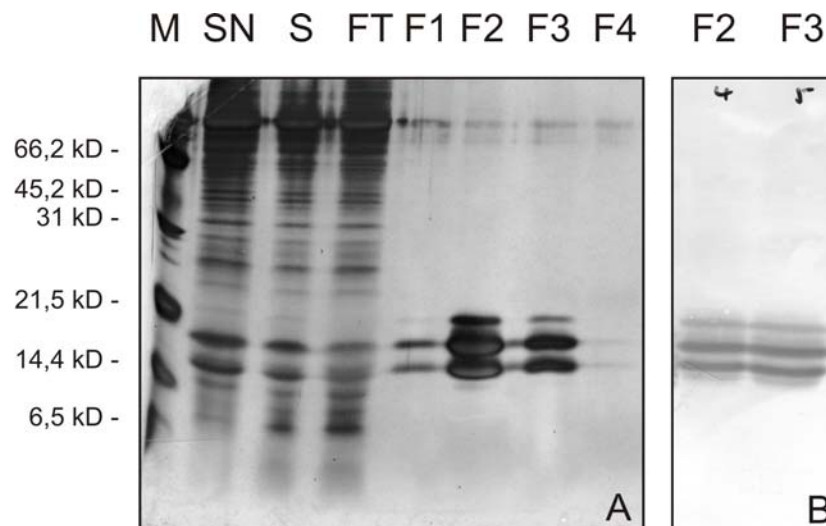


Abbildung 3.15: SDS-PAGE Analyse (Silberfärbung) unter denaturierenden Bedingungen einer IL-3 Aufreinigung (A). M, Molekulargewichtsmarker; SN, Supernatant (Überstand nach Trennung von den Zellen); S, Startmaterial (nach Dialyse und Vorbehandlung); FT, Flow through (Durchlauf); F1-4, Eluatfraktionen. Western Blot Analyse mit einem spezifischen anti-IL-3 Antikörper der 2. und 3. Fraktion einer repräsentativen Reinigung (B).

Eine Färbung mit einem anti-His-Tag Antikörper kam zu demselben Resultat (Ergebnis nicht gezeigt). Wie der Einsatz von nicht-glykosyliertem in, *E. coli* exprimierten IL-3 später noch zeigen wird, ist die Glykosylierung für die Entfaltung der biologischen Aktivität jedoch nicht erforderlich (Yang und Clark, 1987).

3.5.4.2 SDS-PAGE- und Western-Blotting-Analyse des humanen SCF

Der humane SCF wurde in voller Länge und in löslicher Form exprimiert und ist ebenfalls in hoher Reinheit nachweisbar (geschätzt anhand SDS-PAGE: > 95%). Das Produkt konnte im konditionierten Überstand, dem Startmaterial und den Elutionsfraktionen spezifisch nachgewiesen werden. Der rekombinante SCF wies ein apparentes Molekulargewicht von 18,5 bis 24 kDa auf, was gleich bzw. größer ist als das reine Peptid (18,4 kDa, 248 Aminosäuren, ExPASy (Expert Protein Analysis System)-Swiss-Prot, Protein Knowledgebase, <http://au.expasy.org/sprot/>). Der Größenunterschied ist wahrscheinlich auch hier auf eine uneinheitliche Glykosylierung an den 5 N-Glykosylierungsstellen und diversen O-Glykosylierungsstellen des Proteins zurückzuführen. Die SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 3.16 A) zeigt die aufgetretenen Formen des Proteins.

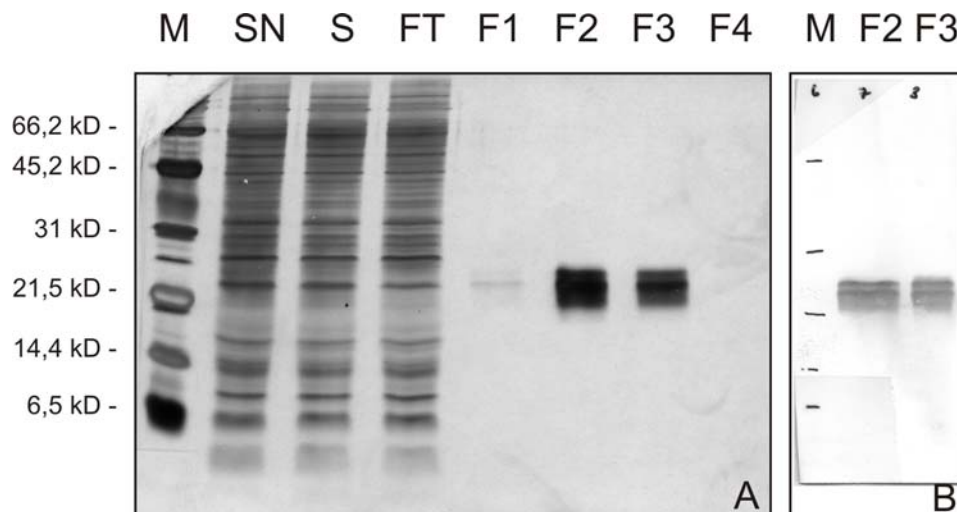


Abbildung 3.16: SDS-PAGE Analyse (Silberfärbung) unter denaturierenden Bedingungen einer SCF Aufreinigung (A). M, Molekulargewichtsmarker; SN, Supernatant (Überstand nach Trennung von den Zellen); S, Startmaterial (nach Dialyse und Vorbehandlung); FT; Flow through (Durchlauf); F1-4, Eluatfraktionen. Western Blot Analyse mit einem spezifischen anti-SCF Antikörper der 2. und 3. Fraktion einer repräsentativen Reinigung (B).

Die molekulare Identität des Proteins wurde zusätzlich über Western-Blotting mit einem spezifischen anti-SCF Antikörper nachgewiesen (Abbildung 3.16 B). Eine Färbung mit einem anti-His-Tag Antikörper kam auch hier zu demselben Resultat (Ergebnis nicht gezeigt). Wie der Einsatz von nicht-glykosyliertem, in *E. coli* exprimierten SCF zeigt, ist die Glykosylierung für die Entfaltung der biologischen Aktivität auch hier nicht erforderlich (Martin et al., 1990). Der erste Bericht über humanen SCF aus dem Baculovirus-Expressionssystem stammt von Wang et al., 1995. Die Gruppe verglich die direkte Infektion von *Bombyx mori* Seidenspinnerlarven mit der von Bm-N Zellen mit einem rekombinanten *Bombyx mori* Kernpolyedervirus.

3.5.4.3 Sequenzierung des gereinigten Interleukin-3 und SCF

Ziel dieser Untersuchung war die zweifelsfreie Bestätigung der Identität der beiden rekombinanten Proteine. Als Proben wurden Eluatfraktionen hoher Reinheit gegen Phosphat-gepufferte Salzlösung (pH 7,4) dialysiert und an die Arbeitsgruppe Proteinsequenzierung der GBF übergeben. Der SCF Probe wurde 1% bovines Serumalbumin zur Stabilisierung zugesetzt. Die Proben wurden mit einen Applied Biosystems Sequenzierautomaten analysiert. Die mittlere Sequenzlänge lag für beide Proteine bei 17 Aminosäuren und lies damit eine eindeutige Identifikation zu. Die für die IL-3-Probe analysierte Aminosäuresequenz entsprach zu 100% der N-terminalen Sequenz des Proteins (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Ergebnis der Proteinsequenzanalyse einer gereinigten Interleukin-3 Eluatfraktion. Die Proben wurden mit einem Applied Biosystems 494A Procise DNA Sequenzierautomat analysiert. Die Identität des Proteins (Interleukin-3, human) wurde nach Sequenzvergleich mit öffentlichen Protein-Sequenz-Datenbanken (ExPASy, <http://au.expasy.org/sprot/>) ermittelt.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Menge [10^{-12} mol]	43	24	21	15	19	13	3	7	13	11	9	5	7	6	4
analysierte Sequenz	Ala	Pro	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Leu	Lys	Thr	Ser	Trp	Val	Asn
Datenbank-Sequenz	Ala	Pro	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Leu	Lys	Thr	Ser	Trp	Val	Asn

Die für die SCF-Probe analysierte Sequenz wies an zwei Stellen, den Aminosäuren in Position 4 und 13, Abweichungen auf. Der Grund hierfür lag in der Kontamination durch das zur Stabilisierung des Proteins zugesetzte bovine Serumalbumin. Die übrigen 13 Aminosäuren entsprachen zu 100% der N-terminalen Sequenz des

Proteins (Tabelle 3.4). Das SCF galt damit ebenfalls als positiv identifiziert. Es existieren, bis auf die im Rahmen dieser Arbeit veröffentlichten Daten (Ding et al. 2003), keine veröffentlichten Berichte über die Expression von humanem Interleukin-3 auf der Basis des Baculovirus-Expressionssystems.

Tabelle 3.4: Ergebnis der Proteinsequenzanalyse einer in Phosphat-Puffer + 1% BSA gelösten SCF Eluatfraktion. Die Proben wurden mit einem Applied Biosystems 473A DNA Sequenzierautomat analysiert. Die Identität des Proteins (Stem Cell Factor (SCF), human) wurden nach Sequenzvergleich mit öffentlichen Protein-Sequenz-Datenbanken (ExPASy, <http://au.expasy.org/sprot/>) ermittelt.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Menge [10^{-12} mol]	67	59	38	-	65	52	67	63	30	40	10	45	-	10	30	20
analysierte Sequenz	Glu	Gly	Ile	-	Arg	Asn	Arg	Val	Thr	Asn	Asn	Val	-	Asp	Val	Thr
Datenbank-Sequenz	Glu	Gly	Ile	Cys	Arg	Asn	Arg	Val	Thr	Asn	Asn	Val	Lys	Asp	Val	Thr

3.5.5 Ausbeuten der Aufreinigungen des SCF und IL-3

Ziel der Produktion der humanen Wachstumsfaktoren war die schnelle Bereitstellung einer ausreichenden Menge von 0,5 bis 1 mg reinem, biologisch aktivem, rekombinantem Protein für die Expansionsexperimente mit primären, humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. In Tabelle 3.5 sind lediglich die Aufreinigungen aufgeführt, die eine Ausbeute größer 50 µg reinen Proteins nach kompletter Aufarbeitung von 500 bis 700 mL Insektenzellkulturüberstand ergaben.

Tabelle 3.5: Ausbeute von Aufreinigungen mit mehr als 50 µg reinem, rekombinantem Protein aus konditioniertem Insektenzellkulturüberstand. Die Reinheit wurde über SDS-PAGE Analyse abgeschätzt. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde ein BCA-Assay eingesetzt.

Aufreinigung Nr.	Protein	Ausbeute [mg]	Zelllinie	Kulturmedium
1	rh IL-3	0,8	SF9	TEX/Asn
2	rh IL-3	1,5	High Five	TEX/Asn
3	rh SCF	0,185	High Five	Insect Express
4	rh SCF	0,05	High Five	Insect Express
5	rh SCF	0,5	High Five	Insect Express

Die maximale Ausbeute lag nach der Aufreinigung im Bereich von 1 bis 3 mg·L⁻¹ und damit auf einem vergleichsweise geringen Niveau. Vergleicht man die Ausbeuten mit

Literaturangaben, so können mit dem Baculovirus-Expressionssystem Expressionsraten von mehreren hundert Milligramm Protein pro Liter Kulturvolumen produziert werden. Betrachtet man jedoch die Produktausbeuten von konstitutiv sekretorischen Proteinen, liegen diese jedoch ebenfalls stark vermindert im Bereich von 1 bis 10 mg·L⁻¹ (Shuler et al., 1995). Nach der zweifelsfreien Identifikation der beiden rekombinanten Proteine mittels SDS-PAGE, Western Blotting und N-terminaler Sequenzierung sollte im nächsten Schritt ihre biologische Aktivität nachgewiesen werden.

3.5.6 Bestimmung der relativen spezifischen biologischen Aktivität

Ziel der Untersuchung war sowohl der qualitative Nachweis als auch die quantitative Analyse einer relativen spezifischen biologischen Aktivität der rekombinanten Wachstumsfaktoren. Basis dieser Untersuchung bildeten Mitogenassays, die auf wachstumsfaktorabhängigen Leukämiezelllinien aufgebaut wurden. Verdünnungsreihen der jeweiligen Faktoren wurden relativ zu kommerziellerhältlichem SCF und IL-3 untersucht. Aufbauend wurden Dosis-Aktivitäts-Diagramme erstellt, die eine Ableitung der spezifischen Aktivitäten mit statistischen Methoden zuließen.

3.5.6.1 Biologische Aktivität des rekombinanten Interleukin-3

Zur Abschätzung der spezifischen Aktivität des Interleukin-3 wurden zwei verschiedene Aufreinigungen des Insektenzell-generierten IL-3 (Aufreinigung Nr.1 und 2) mit kommerziellem rekombinanten IL-3 von PeproTech verglichen. Die Ergebnisse eines repräsentativen Beispiels sind im Dosis-Aktivitäts-Diagramm (Abbildung 3.17 A) dargestellt. Die Analyse der Daten erfolgte mittels grafischer Auswertung im Probability-Diagramm (Probit-Analyse, Abbildung 3.17 B). Im Probit-Diagramm wurden die Daten der [³H]-Thymidin-Aktivität auf der Y-Achse aufgetragen und auf den höchsten der Wert des Standards normiert. Weiterhin ist auf der zweiten Y-Achse der Stimulationsindex als auf die Kontrolle normierte Aktivität angegeben. Im Anschluss wurden diese Daten gegen den Logarithmus zur Basis 2 (log₂) des in der jeweiligen Verdünnungsrate für jeden Schritt errechneten Verdünnungsfaktors

aufgetragen. Auf dem 50%-Aktivitätsniveau wurden die Verdünnungsfaktoren verglichen.

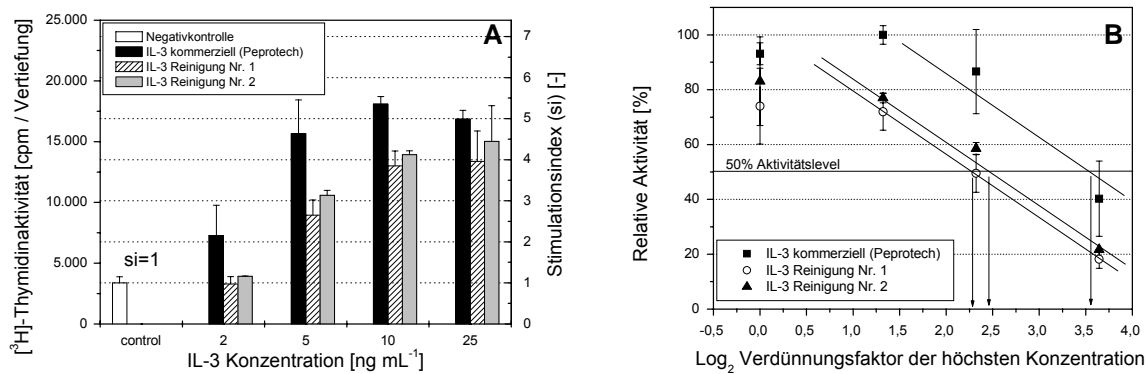


Abbildung 3.17: Dosis-Aktivitätsdiagramm für Interleukin-3 (A). Dargestellt sind verschiedene Proben: kommerziell verfügbares IL-3 aus *E. coli* (PeproTech), und zwei verschiedene IL-3-Aufreinigungen aus konditionierten Insektenzellkulturüberständen (Nr.1 und Nr.2). Die Daten des Mitogenassays ($[^3\text{H}]$ -Thymidininkorporation) wurden als Anteil der höchsten Kontrollaktivität gegen den korrespondierenden Logarithmus zur Basis 2 des Verdünnungsfaktors relativ zur höchsten eingesetzten Konzentration in jeder Verdünnungsreihe aufgetragen. Die Aktivitäten der verschiedenen Proben wurden auf dem 50%-Aktivitätsniveau verglichen, die Aktivität des kommerziellen IL-3 als 100% definiert und die Aktivitäten der verschiedenen Aufreinigungen relativ dazu abgeschätzt (Abb. 3.17 B, Probit-Analyse).

Die Ergebnisse für das gewählte Beispiel einer IL-3 Aktivitätsmessung sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Die nicht gezeigten Ergebnisse des WST-1-Tests erbrachten vergleichbare Resultate.

Tabelle 3.6: Repräsentative Auswertung des Mitogenassays zur Quantifizierung der Aktivität von zwei verschiedenen IL-3 Aufreinigungen. Die Aktivität der IL-3-Reinigungen wurden relativ zu kommerziellem IL-3 auf dem 50%-Aktivitätsniveau verglichen (Spalte 2, vgl. Abbildung 3.17 B).

Probe	$2^{(X\text{-Achsen Schnittpunkt bei } 50\% \text{ Aktivität)}}$	Relative Aktivität [%]
rh IL-3 kommerziell (PeproTech)	11,61	$\frac{11,61}{11,61} = 100\%$
rh IL-3 Reinigung Nr. 1	5,54	$\frac{5,54}{11,61} = 47,6\%$
rh IL-3 Reinigung Nr. 2	4,85	$\frac{4,85}{11,61} = 41,8\%$

Im ausgewählten Beispiel zeigte Reinigung Nr. 1 eine relative Aktivität von 47,6% und Nr. 2 von 41,8%. Im Mittel konnte in 7 Messungen für die IL-3 Aufreinigung aus Überstand Nr.1 eine relative spezifische Aktivität von $46 \pm 18\%$ ermittelt werden. In 5

Messungen für die IL-3 Aufreinigung Nr. 2 konnte eine relative spezifische Aktivität von $45 \pm 10\%$ gegenüber dem kommerziellen Standard aus *E. coli* bestimmt werden.

3.5.6.2 Biologische Aktivität des rekombinanten SCF

Das Verfahren der Probit-Analyse wurde auch für die Abschätzung der relativen spezifischen Aktivität von SCF aus drei verschiedenen Aufreinigungen angewendet. Ein repräsentatives Dosis-Aktivitäts-Diagramm für SCF aus drei SCF Aufreinigungen und einen kommerziellen Vergleichsstandard ist in Abbildung 3.18 A und die korrespondierende Probit-Analyse in Abbildung 3.18 B gezeigt.

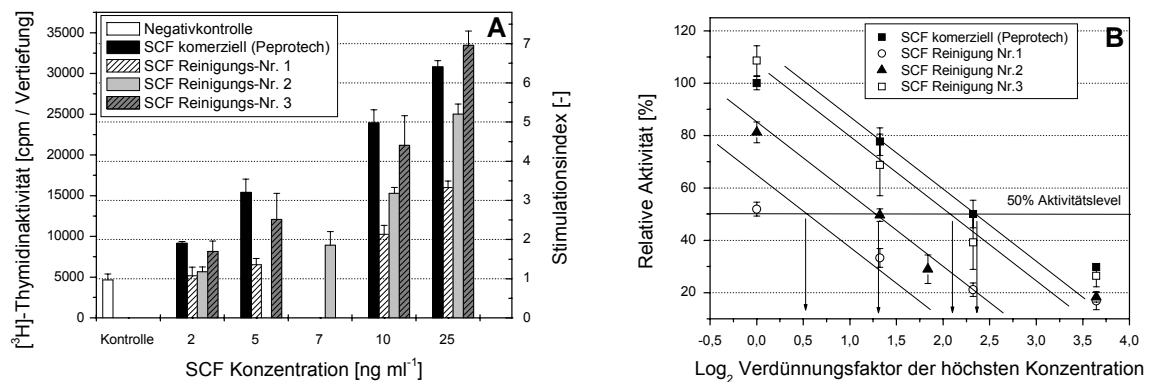


Abbildung 3.18: Dosis-Aktivitätsdiagramm für SCF (A). Dargestellt sind verschiedene Proben: kommerziell verfügbarer SCF aus *E. coli* von PeproTech und drei verschiedene SCF-Aufreinigungen aus konditionierten Insektenzellkulturüberständen (Nr. 1, 2 und 3). Die Daten des Mitogenassays ($[^3\text{H}]$ -Thymidininkorporation) wurden als Anteil der Kontrollaktivität gegen den korrespondierenden Logarithmus zur Basis 2 des Verdünnungsfaktors relativ zur höchsten eingesetzten Konzentration in jeder Verdünnungsreihe aufgetragen. Die Aktivitäten der verschiedenen Proben wurden auf dem 50%-Aktivitätsniveau verglichen, die Aktivität des kommerziellen SCF als 100% definiert und die Aktivitäten des SCF aus den verschiedenen Aufreinigungen relativ dazu abgeschätzt (Abb. 3.18 B, Probit-Analyse).

In dem ausgewählten Beispiel zeigte SCF aus Reinigung Nr. 1 eine relative Aktivität von 28%, Nr. 2 von 47% und Nr. 3 von 83%. Im Mittel konnte in 6 Messungen für SCF aus Reinigung Nr. 1 eine relative spezifische Aktivität von $30 \pm 13\%$ und $54 \pm 12\%$ für Nr. 2 ermittelt werden. Die höchste relative spezifische biologische Aktivität zeigte Reinigung Nr. 3 mit $98 \pm 6\%$ gegenüber dem kommerziellen Standard aus *E. coli* (PeproTech).

Tabelle 3.7: Repräsentative Beispiele zur Auswertung der Mitogenassays zur Quantifizierung der SCF-Aktivität aus drei verschiedenen Reinigungen. Die SCF-Aktivität der Aufreinigungen wurden relativ zu kommerziellem SCF auf dem 50%-Aktivitätsniveau verglichen (Spalte 2, vgl. Abbildung 3.18 B).

Probe	$2^{(X\text{-Achsen Schnittpunkt bei } 50\% \text{ Aktivität})}$	Relative Aktivität [%]
rh SCF kommerziell (PeproTech)	5,17	$\frac{5,16}{5,16} = 100\%$
rh SCF Reinigung Nr. 3	4,28	$\frac{4,28}{5,16} = 82,9\%$
rh SCF Reinigung Nr. 2	2,41	$\frac{2,41}{5,16} = 46,7\%$
rh SCF Reinigung Nr.1	1,45	$\frac{1,45}{5,16} = 28,1\%$

3.5.6.3 Korrektur der biologischen Aktivität des hergestellten Interleukin-3

Anhand der Wachstumsfaktor-abhängigen Zelllinien konnte nur eine, relativ zu kommerziell-erhältlichen Proteinen, unerklärbar niedrige spezifische Aktivität nachgewiesen werden. Dabei haben Querol und Mitarbeiter mit Expansionskulturen CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut glykosyliertes und deglykosyliertes G-CSF, letzteres als Surrogat für bakteriell exprimiertes Protein anzusehen, verglichen (Querol et al., 1998). Sie konnten für die Gesamtzellexpansion, sowie die Expansion von CD34⁺-Zellen und für CFU-GM eine unterschiedliche stimulatorische Wirkung nachweisen. Den Unterschied führten sie in der Hauptsache auf die unterschiedliche Stabilität der beiden Proteine in den *in vitro* Ansätzen zurück. Kubota und Mitarbeiter haben für G-CSF die Hypothese aufgestellt, dass die größere Homologie des glykosylierten Proteins zum Wildtyp eine größere Affinität zum Rezeptor ermöglicht (Kubota et al., 1990). Im Gegensatz zu GM-CSF (Moonen et al., 1987) und EPO (Dube et al., 1988; Takeuchi et al., 1990) gibt es für G-CSF und IL-3 (Yang et al., 1987) keine Hinweise auf eine abweichende biologische Aktivität zwischen glykosylierter und nicht-glykosylierter Form. Die geringere spezifische biologische Aktivität des aufgereinigten Materials gegenüber dem kommerziellen Material war zunächst nicht zu erklären und entsprach nicht den Erwartungen, insbesondere da die Glykosylierung oft mit einer Stabilisierung der Proteine, einer verbesserten Löslichkeit, einem besseren Schutz vor Proteasen und einer Stabilisierung der Konformation des Proteins assoziiert wird (Jenkins und Curling, 1994).

In Gruppenarbeit mit Dr. Hongbiao Ding konnte schließlich über den spezifischen, quantitativen Nachweis von IL-3 im kommerziellen Material, relativ zu den

verschiedenen Aufreinigungen der vorliegenden Arbeit mittels ELISA-Technologie gezeigt werden, dass kommerzielle Hersteller von Wachstumsfaktoren die Chargen überfüllen (Ding et al., 2003). Dies hat für das Untersuchungsmaterial zur Überschätzung des kommerziellen Vergleichsmaterials relativ zu den produzierten Wachstumsfaktoren geführt (siehe Abschnitt 3.5.6.7). Nachgewiesen wurde dies für die IL-3 Chargen Lot Nr. 036131 (für Vergleichbestimmungen verwendet) und Lot Nr. 08113, PeproTech, die 21-fach bzw. 2-fach überfüllt waren. Die Analyse einer Charge eines anderen Herstellers bestätigte diese Praxis (R&D Systems, Lot Nr. AF 142091, 15-fache Überfüllung). Um die ausgewiesenen biologischen Aktivitäten in den Einzelverpackungen zu erreichen, füllen Hersteller scheinbar unterschiedliche Mengen dieser rekombinanten Proteine ab. Dadurch werden Unterschiede in den spezifischen biologischen Aktivitäten zwischen unterschiedlichen Produktionsläufen ausgeglichen. Die korrigierten Ergebnisse der Bestimmung der spezifischen biologischen Aktivität für IL-3 sind in Tabelle 3.8 aufgeführt (Ding et al., 2003).

Tabelle 3.8: Korrektur der relativen biologischen Proteinaktivität basierend auf den Ergebnissen des ELISA-Tests.

Assay	Proteinproben	relative Aktivität [%]	korrigierte Aktivität [%]
$[^3\text{H}]$ -Thymidininkorporation	IL-3 PeproTech (Lot 036131)	100	100
	Aufreinigung Nr. 1	67,7	1422
	Aufreinigung Nr. 2	65,9	1384
WST-1-Test	IL-3 PeproTech (Lot 036131)	100	100
	Aufreinigung Nr. 1	25	525
	Aufreinigung Nr. 2	40,6	853
Resultat (n=11)	IL-3 PeproTech (Lot 036131)	100	100
	Exprimiertes IL-3 (Mittelwert \pm Standardabweichung)	46 \pm 16	966 \pm 336

Die korrigierten Ergebnisse zeigen eine deutlich höhere spezifische biologische Aktivität für das Insektenzell-exprimierte IL-3 im Vergleich zu den kommerziellen Proteinen. Die Praxis der Überfüllung von Chargen zum Ausgleich von so genannten Batch-to-Batch-Variances in der spezifischen Aktivität kann für das verwendete SCF ebenfalls vermutet werden, obwohl kein quantitativer ELISA-Test zum Nachweis

durchgeführt wurde. Die These einer höheren Aktivität glykosylierten SCFs im Vergleich zu unglykosyliertem wird durch die Ergebnisse von Han et al. (2004) unterstützt. Sie haben eine neue duale Variante des SCF in *Bombyx mori* Larven mit einer Hämolymphekonzentration von $5,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ exprimieren können (Han et al., 2004). Dieses mit einem stabilen Linker verbundene Dipeptid zeigte eine höhere spezifische Aktivität als singuläres SCF aus *E. coli* und ebenfalls eine höhere Affinität zum zellulären Oberflächenrezeptor.

Der nächste Schritt galt nun der Übertragung der viel versprechenden Ergebnisse auf humane Stamm- und Vorläuferzellen.

3.5.7 Einsatz Insektenzell-sekretierter Wachstumsfaktoren

Neben der Stimulation der Proliferation primärer Zellen sollte besonders auf die Differenzierung der primären Stamm- und Vorläuferzellen geachtet werden. Ziel war es nachzuweisen, dass es keinen Unterschied in der Differenzierung der Zellen im Vergleich zu den bakteriell-produzierten Proteinen gab.

Dazu wurden Kulturen in 24-Loch-Zellkulturplatten mit einem Kulturvolumen von 1,5 mL durchgeführt und mit einer Startzellkonzentration von $1 \cdot 10^5 \text{ CD34}^+ \text{ mL}^{-1}$ inokuliert. Der Anteil der CD34^+ -Zellpopulation im Inokulum betrug 25%. Für die umfangreiche Zellanalytik wurden repräsentative Parallelkulturen nach 72, 144, 192 und 288 h Kultur geerntet. Dem Grundmedium wurden neben humanem AB-Serum (3%), $50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ Penicillin, $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Streptomycin und $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hydrocortison folgende Wachstumsfaktoren zugesetzt: $300 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL-1 β und $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ Flt-3 Ligand. Kompletmedium ohne die SCF- und IL-3-Zusätze wurde als Kontrollansatz genutzt. Den Ansätzen A bis D wurden unterschiedliche Kombinationen aus kommerziellem (kom.) und auf Basis des Baculovirus-Expressionssystem produzierten (bac.) Interleukin-3 und SCF in identischen, auf die biologische Aktivität korrigierten Konzentrationen von $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ bzw. $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ zugesetzt. Der Verlauf der Gesamtzellexpansion als Funktion der Zeit ist in Abbildung 3.19 A dargestellt. Die maximale Expansion wurde in den 4 Vergleichsansätzen nach 144 h Kultur erreicht. Die Mittelwerte sind zu diesem Zeitpunkt auf dem 95%-Wahrscheinlichkeitsniveau nicht unterschiedlich ($p=0,122 < p_{A-D} < 0,605$). Danach sanken die Gesamtzellexpansionsraten bis zum Ende der Kultur kontinuierlich unter das Ausgangsniveau ab (0,19-fach bis 0,25-fach).

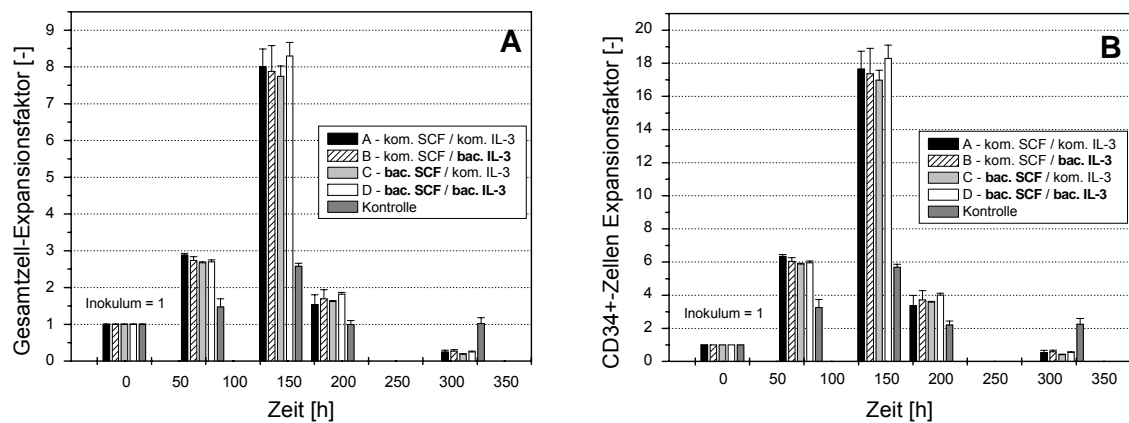


Abbildung 3.19: Vergleich der Insektenzell-sekretierten (bac.) relativ zu kommerziellen bakteriell-abgeleiteten (kom.) Wachstumsfaktoren (Quelle: PeproTech Inc.). Einfluss der Wachstumsfaktoren auf den Gesamtzell-Expansionsfaktor (A) und den Expansionsfaktor CD34⁺-Zellen (B). Die eingesetzten Konzentrationen betragen: SCF: 50 ng·mL⁻¹, IL-3: 25 ng·mL⁻¹.

Für die Glukoseverbrauchs-, Laktatproduktionsraten und den Anteil apoptotischer Zellen konnten ebenfalls keine Unterschiede gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Die Expansion der CD34-positiven Zellen zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf (Abbildung 3.19 B). Die Zahl der CD34⁺-Zellen nahm vom Inokulum bis 144 h Kultur zu. Im weiteren Verlauf kommt es aufgrund der fortschreitenden Differenzierung der Zellen zu einer kontinuierlichen Abnahme. Auch für die Expansion CD34⁺-Zellen lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen ($p=0,189 < p_{A-D} < 0,602$).

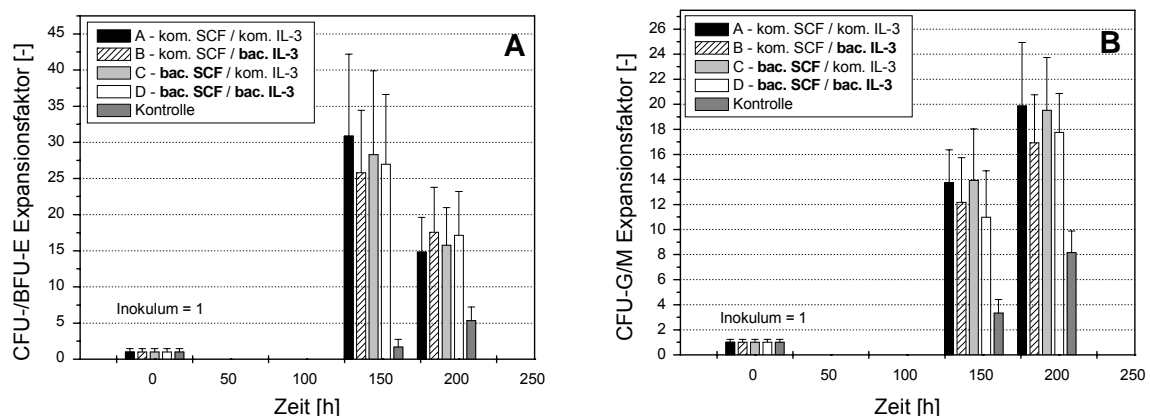


Abbildung 3.20: Vergleich von mit Insektenzellen produzierten (bac.) mit kommerziellen, bakteriell produzierten (kom.) Wachstumsfaktoren. Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Expansion der erythrozytären (A, CFU-/BFU-E) und granulozytär-monozytären (B, CFU-G/M) Vorläuferzellen.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der linienspezifischen Vorläuferzellen, zeigt sich auch hier eine absolut gleichwertige Potenz der Insektenzell-produzierten Wachstumsfaktoren relativ zu den kommerziellen Proteinen. Nach 192 h Kultur war die maximale Expansion für die erythrozytären Vorläufer mit 26 ± 9 -fach (B) bis 31 ± 12 -fach (A) zu verzeichnen (Abbildung 3.20 A). Auch im Hinblick auf diesen Parameter wurde kein signifikanter Unterschied gefunden ($p=0,707 < p_{A-D} < 0,893$). Der zeitliche Verlauf der granulozytär-monozytären Vorläuferzellen ist in Abbildung 3.20 B dargestellt. Die Zellzahl stieg ausgehend vom Inokulum bis zum Ende der Kultur an. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht ermittelt werden ($p=0,527 < p_{A-D} < 0,986$). Die biologische Aktivität der produzierten, rekombinanten, humanen Wachstumsfaktoren wurde somit erfolgreich mit humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen und mit wachstumsfaktorabhängigen Zelllinien analysiert. Bei den auf den Primärzellen basierenden Experimenten konnte eine identische Differenzierung der primären Stamm- und Vorläuferzellen demonstriert werden.

3.6 *Permanente Stimulation mit Wachstumsfaktoren*

Ziel dieser Untersuchung war die Aufklärung der Notwendigkeit einer permanenten Stimulation, d.h. der permanenten Präsenz von Wachstumsfaktoren. Diese Fragestellung ist besonders für kontinuierliche Kultivierungen von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen interessant, da ggf. auf eine Supplementierung des Perfusionsmediums mit entsprechenden Wachstumsfaktoren verzichtet werden könnte. Dadurch könnten erhebliche Kosten eingespart werden, denn der Anteil der Wachstumsfaktoren an den reinen Medienkosten (Preis für 1 Liter Zellkulturmedium mit SCF, Flt-3 Ligand, IL-3, IL-6, TPO, EPO: 2.000 bis 7.000 EUR) beträgt ca. 90%. Die Kulturen wurden in 24-Loch-Zellkulturplatten mit einem Kulturvolumen von 1,5 mL durchgeführt und mit einer Startzellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ CD34⁺ mL⁻¹ inokuliert. Der Anteil der CD34⁺-Zellpopulation im Inokulum betrug mehr als 95%. Für die umfangreiche Zellanalytik wurden repräsentative Parallelansätze nach 48, 96, 144 und 192 h nach der initialen 72-stündigen Inkubationsphase geerntet. Dem Grundmedium wurde neben humanem AB-Serum (3%), 50 U·mL⁻¹ Penicillin, 50 µg·mL⁻¹ Streptomycin und 1 µmol·L⁻¹ Hydrocortison folgende Wachstumsfaktoren zugesetzt: 50 µg·mL⁻¹ SCF, 25 µg·mL⁻¹ IL-3 und 50 µg·mL⁻¹ Flt-3 Ligand. Das Inokulum für beide Ansätze (1 und 2) wurde für 72 h in einer 25cm²-Zellkulturflasche

in dem oben angegebenen Medium präinkubiert. Nach 72 h, in den Abb. 3.21 A und B. als Stunde 0 dargestellt, wurden die Zellen für den Ansatz 1 (mit Stimulation) in frisches Grundmedium inklusive Wachstumsfaktoren und die Zellen für Ansatz 2 (ohne Stimulation) in frisches Grundmedium ohne Wachstumsfaktoren überführt und wie oben angegeben weiterkultiviert.

Der Verlauf der Gesamtzellexpansion als Funktion der Zeit ist in Abbildung 3.21 A dargestellt. Der Expansionsfaktor steigt für Ansatz 2 von 5-fach nach 96 h auf 10-fach nach 144 h an. Ansatz 1 mit Wachstumsfaktorstimulation erreichte nach 96 h eine 10-fache Expansion ($p=0,017$) und stieg sogar weiter bis auf 31-fach an. Die Analyse der CD34-positiven Zellen offenbarte ebenfalls einen Vorteil für die permanente Wachstumsfaktorstimulation. Durch die fortschreitende Differenzierung nahm die Zahl der CD34⁺-Zellen nach der 72-stündigen Inkubation in beiden Versuchsansätzen kontinuierlich ab. Obgleich der Unterschied deutlich erscheint, konnten weder nach 48 h ($p=0,098$), 96 h ($p=0,32$) noch nach 144 h ($p=0,155$) signifikant niedrigere Expansionsfaktoren für Ansatz 2 bestimmt werden. Nach 192 h schließlich sank die Gesamtzellzahl CD34⁺-Zellen auf die Hälfte der Ausgangszellmenge, während diese im Ansatz 1 mit 1,2-fach erhalten werden konnten ($p=0,043$).

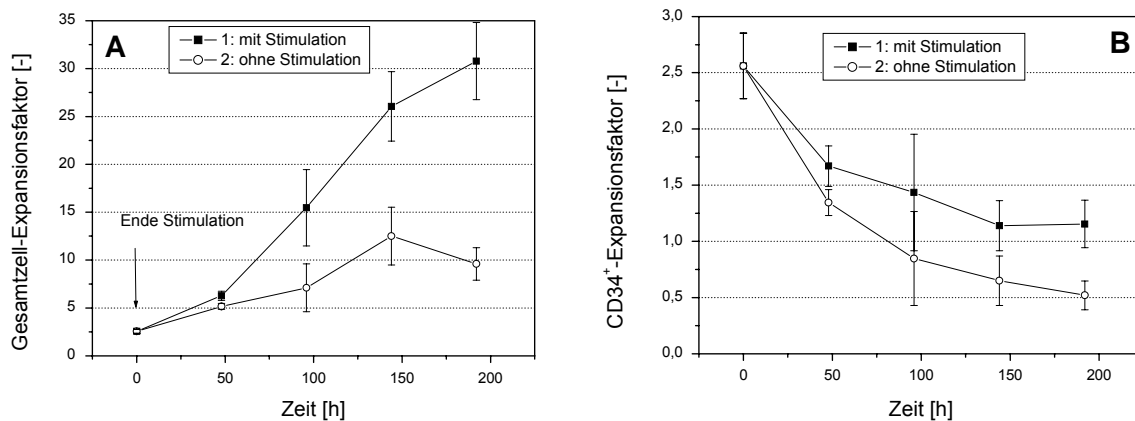


Abbildung 3.21: Einfluss einer permanenten Wachstumsfaktor-Stimulation auf den zeitlichen Verlauf der Gesamtzellen (A) und der CD34⁺-Zellen (B). Beide Ansätze wurden zunächst 72 h (Tag -3 bis t = 0 h) in Gegenwart der angegebenen Wachstumsfaktorkombination kultiviert. Danach erfolgte eine Überführung in wachstumsfaktorhaltiges Grundmedium (Ansatz 1) bzw. wachstumsfaktorfreies Grundmedium (Ansatz 2).

Eine Analyse des zeitlichen Verlaufs der linienspezifischen Vorläuferzellen ergibt auch hier deutliche Unterschiede. Wurde nach 48 h das Signifikanzniveau noch nicht erreicht ($p=0,47$), war nach 96 h der Kultur in Ansatz 1 für die Erythrozytären

Vorläufer ein signifikant höheres Ergebnis mit einer 17 ± 5 -fachen Expansion zu verzeichnen ($p=0,021$). Dieses Verhältnis war auch nach 144 h statistisch signifikant ($p=0,032$).

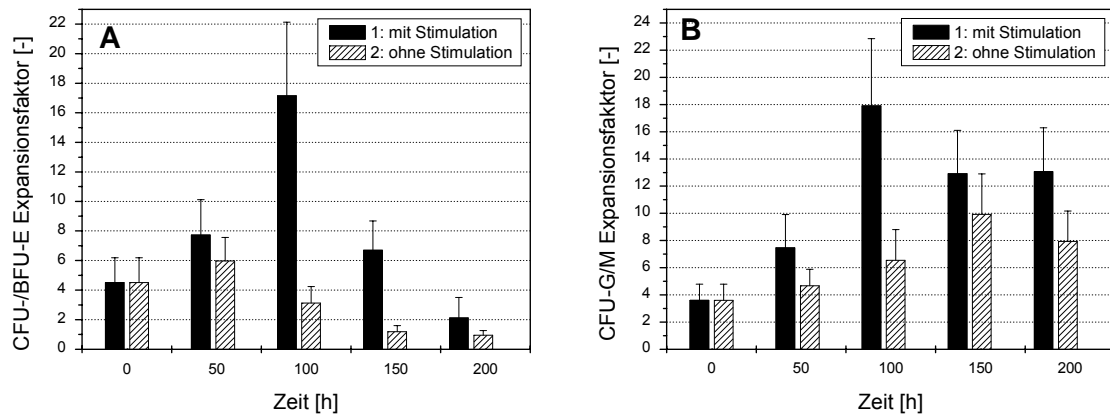


Abbildung 3.22: Einfluss einer permanenten Stimulation auf den zeitlichen Verlauf der Erythrozytären (A) und granulozytär-monozytären Vorläuferzellen (B). Die Zellen in Ansatz 2 wurden 72 h (Tag -3 bis $t = 0$ h) in Gegenwart von Wachstumsfaktoren kultiviert, die Zellen in Ansatz 1 über die gesamte Kulturdauer.

Der zeitliche Verlauf der granulozytär-monozytären Vorläuferzellen ist in Abbildung 3.22 B dargestellt. Die Expansion erreichte in Ansatz 1 nach 96 h das Maximum (17 ± 5 -fach) und lag deutlich, aber nicht signifikant, über dem Ansatz 2 ($p=0,057$). Auch der weitere Verlauf ließ für den Ansatz 1 ein besseres Ergebnis erahnen, die Differenz erreichte jedoch keine Signifikanz mehr. Es zeigte sich, dass der Vorteil der permanenten Stimulation gegenüber einer 3-tägigen Initialen Stimations-/Konditionierungsphase mit dem identischen Wachstumsfaktorcocktail im Hinblick auf alle betrachteten Parameter deutlich wird. Koller und Mitarbeiter haben dazu den Verbrauch von Wachstumsfaktoren untersucht. Sie konnten zeigen, dass SCF, IL-3 und EPO zu einer Gruppe von Wachstumsfaktoren gehören, die prinzipiell verbraucht werden und dass die zellspezifische Aufnahmerate mit zunehmender Kulturdauer ebenfalls zunimmt (Koller et al., 1995b). Um die Mechanismen der Notwendigkeit einer Stimulation weiter aufzuklären, bieten sich zwei weiterführende Untersuchungen an. Am naheliegendsten wäre es eine Analyse der minimal notwendigen Stimulationsdauer mit Wachstumsfaktoren durchzuführen. Diese ist zugleich abhängig von der insgesamt angestrebten Kulturdauer, vorgegeben durch eine minimale Expansionsleistung oder die maximale Differenzierung der Stamm- und Vorläuferzellen. Die eigenen Daten zeigten anhand der aufgereinigten

Populationen CD34⁺-Zellen eindeutig, dass die 3-tägige Stimulation maximal 48 h nachwirkte. Die Stimulation bis zum letzten Kulturtag erscheint nicht zwangsläufig notwendig. Eine weitere Möglichkeit liegt in einer intermittierenden Stimulation mit Wachstumsfaktor-haltigem Medium. Die technischen Automatisierungsmöglichkeiten einer Bioreaktoranlage versetzen den Experimentator in die Lage die Kultur z. B. nur jeden zweiten Tag mit Wachstumsfaktor-haltigem Medium zu versorgen. Dies könnte ebenfalls den Verbrauch und damit auch die Kosten für Wachstumsfaktoren im Rahmen kontinuierlicher Kultivierungen reduzieren.

3.7 *Einsatz von Animal Derived Factors als Serumersatz*

Eine Reihe von so genannten ADF (*engl.* Animal Derived Factors) sind in der modernen Zellkulturtechnologie zur Substitution von Serumfunktionen seit den 80er Jahren etabliert (Barnes und Sato, 1980; Iscove, 1980). Einen sehr ausführlichen Übersichtsartikel zum Thema serumfreie Zellkultur hat Bjare im Jahr 1992 geschrieben (Bjare, 1992). Merten beschreibt die möglichen Gefahren und daraus folgenden Sicherheitsbetrachtungen, die beim Einsatz von Serum und ADF im Hinblick auf virale, bakterielle Kontaminationen oder Prionen zu bedenken sind (Merten, 1999). Der Beitrag enthält einen umfangreichen Überblick über rekombinante, pflanzliche oder synthetische Alternativen zu tierischen Quellen. Als allgemeine Beispiele werden Ersatzstoffe für z. B. Albumin, Transferrin und speziell für die Kultur adhärenter Zellen Fibronektin oder rekombinantes Trypsin aufgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es das Potential einiger ADF im Hinblick auf eine mögliche Serumsubstitution für die Expansion peripherer Blutstammzellen zu untersuchen. Da zum Einsatz am Menschen zugelassen Varianten, zum jetzigen Zeitpunkt deutlich teurer und teilweise gar nicht verfügbar sind, wurde auf Materialien aus tierischen Quellen zurückgegriffen.

Die Kulturen wurden in 24-Loch-Zellkulturplatten mit einem Kulturvolumen von 1,5 mL durchgeführt und mit einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ CD34⁺ mL⁻¹ inokuliert. Der Anteil der CD34⁺-Zellpopulation im Inokulum betrug > 95%. Für die Zellanalytik wurden repräsentative Parallelansätze nach 72, 144, 192, und 312 h geerntet. StemSpan SFM wurde neben 50 U·mL⁻¹ Penicillin, 50 µg·mL⁻¹ Streptomycin und 1 µmol·L⁻¹ Hydrocortison Wachstumsfaktoren zugesetzt: 50 µg·mL⁻¹ SCF, 25 µg·mL⁻¹ IL-3 und 50 µg·mL⁻¹ Flt-3 Ligand. Die Ansätze 1 bis 3 enthielten verschiedene

Konzentrationen von humanem AB-Serum: 1, 4 und 10%. Ansatz 4 wurde statt mit Serum mit $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ humanem Transferrin, $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ humanem Serumalbumin $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Schweineinsulin und 1% Lipidmix supplementiert.

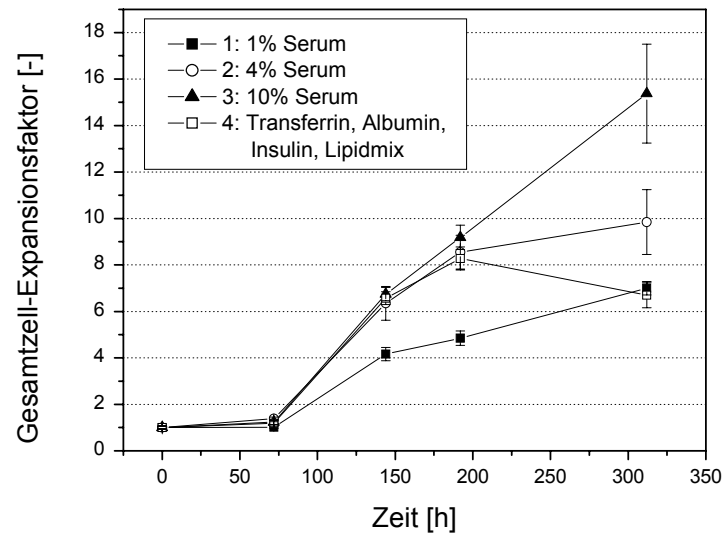


Abbildung 3.23: Einsatz von „animal derived factors“ zur Substitution von Serum.

Im Rahmen von Vorversuchen wurden drei verschiedene Serumkonzentrationen mit einem serumfreien, aber proteinhaltigen Ansatz verglichen. Betrachtet man die zeitliche Entwicklung der Gesamtzellexpansion erkennt man, dass bis einschließlich 192 h Kultur die Ansätze 2 bis 4 vergleichbare Ergebnisse erzielen. Der Ansatz mit 1% Serum liegt mit 5-fach deutlich darunter ($p < 0,025$). Zum Ende der Kultur erreichte der Ansatz 3 (10% Serum) den höchsten Gesamtzellexpansionsfaktor von 15, gefolgt vom Ansatz 2 (4% Serum) mit 10-fach ($p = 0,046$). Die Gesamtzellzahl im serumfreien Ansatz geht nach 312 h Kultur auf das Niveau des Ansatzes mit 1% Serum zurück.

Aus dem Ergebnis des Vorversuchs wurden folgende Fragestellungen abgeleitet: 1. Der serumfreie Ansatz unterstützt bis zu 192 h Kultur eine vergleichbare Expansionsleistung. Sind ab diesem Zeitpunkt essenzielle Inhaltsstoffe verbraucht oder toxische Metabolite akkumuliert worden? 2. Hat die Eliminierung des Humanserums aus dem Kulturmedium einen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen?

Van den Oudenrijn hat 2,5% als ideale Konzentration für humanes AB-Plasma ermittelt (Van den Oudenrijn et al., 2001). Bei höherer Konzentration ist von einer spezifischen Inhibierung der megakaryozytären Vorläuferzellen ($\text{CD}34^+ \text{CD}41^+$ -Zellen) und damit einer Retardierung der Thrombopoese auszugehen. Der

inhibitorische Effekt wurde auf hohe Konzentrationen von TGF- β 1 zurückgeführt (Berthier et al., 1993).

Zur Beantwortung der Fragestellungen wurde deshalb ein Ansatz mit 4% humanem AB-Serum, ADF- und unsupplementiertem StemSpan SFM verglichen. Die Kulturen wurden in 24-Loch-Zellkulturplatten mit einem Kulturvolumen von 1,5 mL durchgeführt und mit einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ CD34⁺-Zellen mL⁻¹ inokuliert. Der Anteil der CD34⁺-Zellpopulation im Inokulum betrug mehr als 95%. Für die Zellanalytik wurden repräsentative Parallelansätze nach 72, 120, 168 und 264 h Kultur geerntet. Dem Basalmedium StemSpan SFM wurde neben 50 U·mL⁻¹ Penicillin, 50 μ g·mL⁻¹ Streptomycin und 1 μ mol·L⁻¹ Hydrocortison und Wachstumsfaktoren zugesetzt: 50 ng·mL⁻¹ SCF, 25 ng·mL⁻¹ IL-3 und 50 ng·mL⁻¹ Flt-3 Ligand (Ansatz 3). Zu Ansatz 1 wurden zusätzlich 4% humanes AB-Serum zugegeben. Ansatz 2 wurde statt Serum mit 100 μ g·mL⁻¹ humanem Transferrin, 1% humanem Serumalbumin, 10 μ g·mL⁻¹ Schweineinsulin und 1% Lipidmix (TAIL) supplementiert.

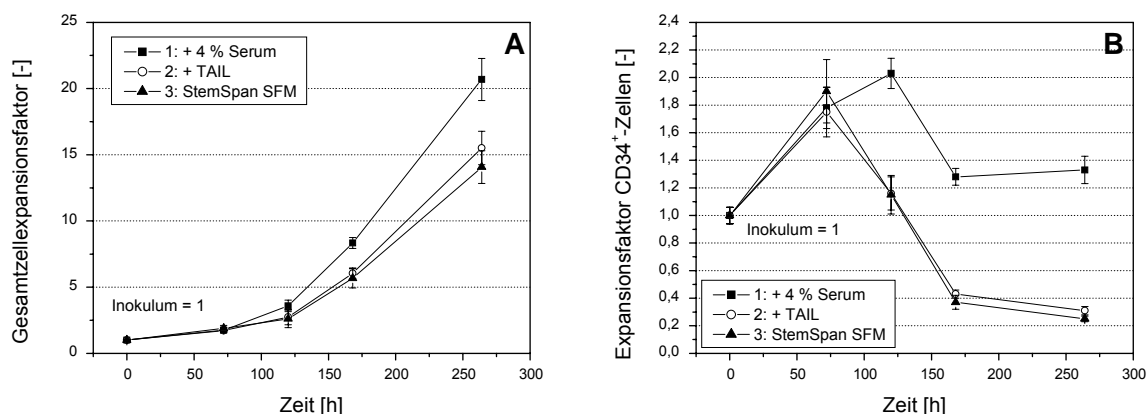


Abbildung 3.24: Einfluss des Einsatzes von Serum bzw. ADF auf den Gesamtzellexpansionsfaktor (A) und auf den Expansionsfaktor CD34⁺-Zellen (B).

Die zeitliche Entwicklung der Gesamtzellexpansionsfaktoren (Abbildung 3.24 A) zeigte, dass der Ansatz mit 4% Humanserum (Ansatz 1) die Proliferation über den gesamten Kultivierungszeitraum am besten unterstützt. Ausgehend vom Inokulum expandierten die Zellen in Ansatz 1 nach 168 h bis auf das 8-fache und bis auf das 21-fache zum Ende der Kultur. Damit verglichen konnten für die Ansätze 2 und 3 nach 168 h eine 6-fache ($p_{1-2,3} < 0,01$) Expansion und nach 264 h eine 15,5-fache ($p_{1-2} = 0,04$) bzw. 14-fache ($p_{1-3} = 0,02$) Expansion erreicht werden. Betrachtet man den Verlauf der CD34-exprimierenden Zellen, so zeigt sich, dass nach 72 h alle Ansätze

ihr höchstes Niveau mit einer knappen Verdoppelung erreichten. Danach kam es zu einem vergleichbaren Verlust CD34-exprimierender Zellen in den Ansätzen 2 und 3 bis auf Werte von 0,4-fach nach 168 h und 0,3-fach zum Ende der Kultur. Im Ansatz 1 mit 4% AB-Serum sanken die Werte lediglich auf einen Faktor von ca. 1,3 ($p=0,001$) ab und blieben somit über der Zellzahl des Inokulums.

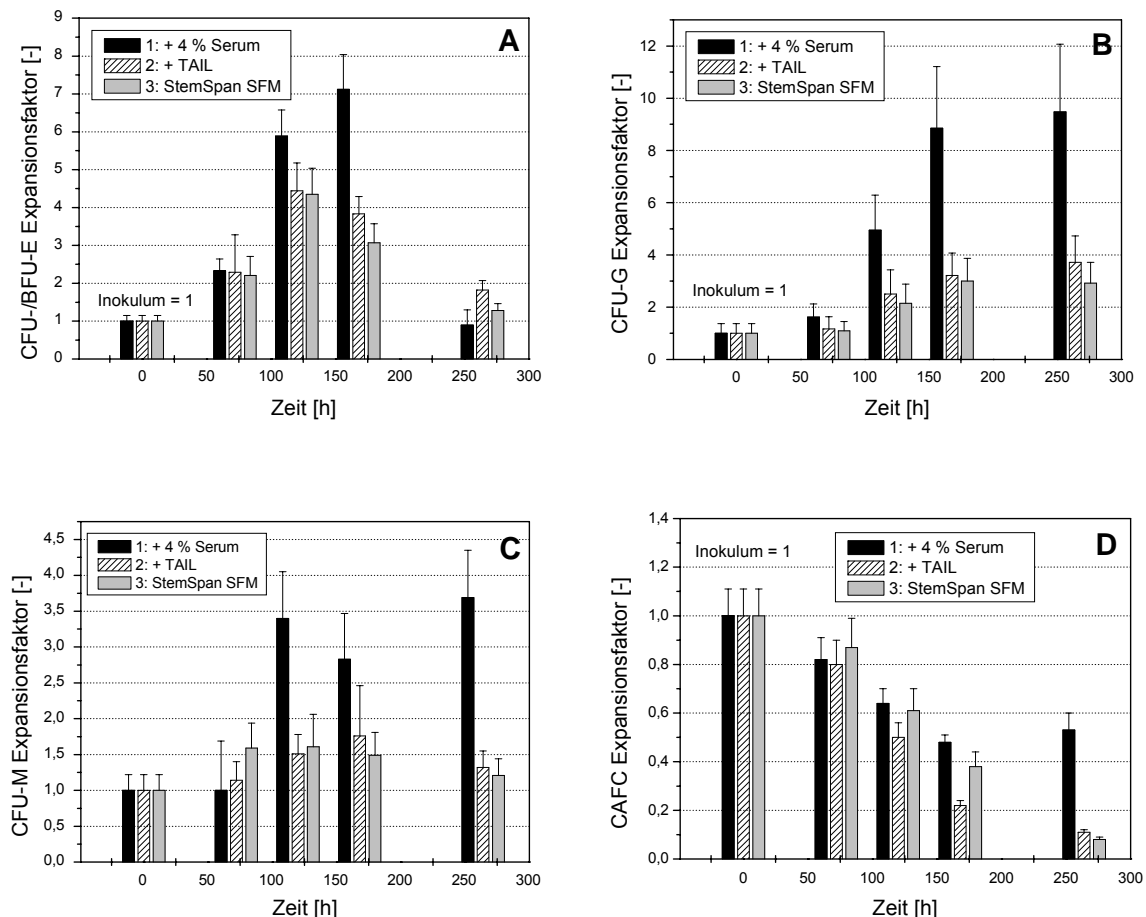


Abbildung 3.25: Einfluss des Einsatzes von Serum bzw. ADF auf den zeitlichen Verlauf der Expansion erythrozytärer (A), granulozytärer (B), monozytärer (C) Vorläuferzellen und früher Stammzellen wie den Cobblestone-Area Forming Cells (CAFC, D).

Der zeitliche Verlauf mittels biologischer Assays erfassbarer Stamm- und Vorläuferzellen zeigte ebenfalls für den Ansatz mit 4% AB-Serum deutliche Vorteile. Der Verlauf der erythrozytären Vorläuferzellen (Abb. 3.25 A) wies ausgehend vom Start der Kultur zwischen 120 und 168 h die maximal erreichten Expansionsfaktoren von 6 bzw. 7 auf. Ansatz 2 und 3 zeigten zu diesen Zeitpunkten Faktoren von 4,4 ($p_{1-2}>0,13$) bzw. 3,3 ($p_{1-3}<0,02$). Danach fielen die Expansionsfaktoren aller Ansätze wieder auf Werte zwischen 1 und 2 zurück. Für die granulozytären Vorläufer (Abb. 3.25 B) konnte ebenfalls an allen Versuchstagen ein signifikanter Vorteil für Ansatz 1

gezeigt werden. In allen Ansätzen kam es einschließlich der letzten beiden gemessenen Kulturtage zu einem kontinuierlichen Anstieg der Zellzahl der CFU-G. Dabei wurden die höchsten Werte im Ansatz 1 erreicht (168 h: 9 ± 2 -fach, $p=0,054$; 264 h: 10 ± 3 -fach, $p=0,0504$). Ansatz 2 und 3 zeigten relativ zu Ansatz 1 deutlich reduzierte Expansionsfaktoren nach 168 und 264 h. Die höchsten Expansionsfaktoren für die monozytären Vorläufer (Abb. 3.25 C) wurden ebenfalls im serumhaltigen Ansatz 1 gefunden. Zwischen 120 und 264 h Kultur wurden Expansionsfaktoren zwischen 3 und 4 verzeichnet. Im Vergleich dazu, kamen die Ansätze 2 und 3 in diesem Zeitabschnitt auf Expansionsfaktoren lediglich 1,2 und 1,8 (120 h: $p_{1-2,3} < 0,045$; 168 h: $p_{1-2}=0,23$ bzw. $p_{1-3}=0,07$, 264 h: $p_{1-2,3} < 0,016$). Zwischen Ansatz 2 und 3 wurde kein Unterschied deutlich. Die Analyse der CAFC als Funktion der Zeit zeigte (Abb. 3.25 D), dass keiner der Ansätze geeignet war die Zellen des Inokulums zu erhalten. In den Ansätzen 2 und 3 kam es bis zu bis zum Ende der Kultur ($p_{1-2,3} < 0,017$) zu einem kontinuierlichen Verlust an Stammzellen. Auch die Ergebnisse in Ansatz 1 zeigten sich nach anfänglichen Verlusten zwischen 168 und 264 h der Kultur auf dem Niveau von 0,6-fach stagnierend.

Nach der Analyse der Medien hinsichtlich Grundzusammensetzung, Glukose und Aminosäuren, wurde die Möglichkeit der Substitution des Serums durch Zugabe von Transferrin, Albumin, Insulin und einem Lipidmix (TAIL) geprüft. Ein einzelner vielversprechender Vorversuch (Abbildung 3.23), in dem 3 verschiedene Serumkonzentrationen vergleichend zu einem TAIL-Ansatz untersucht wurde, schien auf eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse hinsichtlich der Gesamtzellexpansion hinzuweisen. Hier zeigte sich, dass je höher die Serumkonzentration, im untersuchten Bereich von 1 bis 10%, desto besser war auch die Expansion der Zellen. Die positiven Ergebnisse des serumfreien Ansatzes konnten in den darauffolgenden Wiederholungen nicht bestätigt werden. Aufgrund der reichhaltigen Zusammensetzung des serumfreien StemSpan SFM, das in seiner Standardformulierung bereits Varianten der zugesetzten Proteine enthält (bovines Pankreas-Insulin: $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, bovines Serumalbumin: 1%, humanes Transferrin: $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), kommt die Zugabe der aufgeführten Proteine und Hormone lediglich einer Konzentrationserhöhung gleich. Der zusätzliche stimulatorische Effekt blieb dadurch klein und nicht signifikant. Die Expansionsleistungen des Ansatzes mit 4% humanem AB-Serum wurden in keiner Hinsicht erreicht. In zukünftigen Untersuchungen sollten die sog. Animal Derived Factors durch Proteine ersetzt werden, die nicht aus

tierischen Quellen gewonnen werden (Non Animal Origin-Proteine). Diese Proteine stammen häufig aus pflanzlichen Quellen oder sind rekombinant hergestellt und können damit das Problem einer Übertragung von viralen Kontaminationen oder Prionen aus den tierischen Quellen umgehen. Der Nachweis der Abwesenheit dieser Agenzien aus tierischen Quellen im Rahmen der Herstellung von Arzneimitteln ist äußerst zeit- und kostenintensiv und bleibt oft unvollständig. Die in der deutschen Pharmakopoe (Deutsches Arzneibuch) vorgeschriebenen Methoden zur Virusinaktivierung sind auf lebende Zellen nicht anwendbar. Sandstrom et al. (1996) haben sehr ausführliche Untersuchungen zum Thema serumfreie Kultur von hämatopoetischen Progenitoren durchgeführt. Sie haben für eine Vielzahl von Medienkomponenten in einer für den Einsatz am Menschen zugelassenen Form, experimentell die optimale Konzentration ermittelt und eine eigene Formulierung veröffentlicht. Diese haben daraufhin mit einer Reihe von kommerziellen Medien und mit anderen offen gelegten Formulierungen verglichen (Drouet et al., 1989; Lansdorp und Dragowska, 1992; Migliaccio et al., 1988). Sie konnten an mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut zeigen, dass hinsichtlich Gesamtzellexpansion und CFU-Expansion serumhaltige Medien überlegen sind. Beim Einsatz von peripheren mononukleären Zellen jedoch konnten sie mit serumfreien, proteinhaltigen Medien vergleichbare Ergebnisse erzielen. Eine ausführliche Übersicht zum Thema serumfreie Kultur von hämatopoetischen Zellen ist auch bei Lebkowski et al., 1995 zu finden. Almeida-Porada et al. haben mit CD34⁺-Zellen aus Knochenmarkproben zeigen können, dass die Gesamtzellexpansion in Anwesenheit von Serum besser unterstützt wird (Almeida-Porada et al., 2000). Für ihre Medienformulierung wurden allerdings vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Expansion von CD34⁺CD38⁻ Zellen, BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM erreicht. Die primäre und sekundäre Transplantation von frischen, mit oder ohne Serum kultivierten Zellen, in humanisierte Schaf-Chimären zeigte, dass ohne Serum kultivierte Zellen (3 Tage in serumfreier Kultur) den höchsten Anteil humaner Zellen im Knochenmark der Empfängertiere, sowohl in primärer als auch sekundärer Transplantation erreichten. Paquette und Mitarbeiter haben 1998 aus Ficoll-separierten und unmanipulierten, peripheren, mononukleären Zellen nachweisen können, dass die Zugabe von 2% autologem Serum sogar zu einer Verringerung der Expansion führen kann (Paquette et al., 1998). Yao und Mitarbeiter haben in ihren Untersuchungen die optimale Kombination aus 10 g·L⁻¹ BSA (bovines Serumalbumin,), 10 µg·mL⁻¹ Insulin,

Transferrin ($0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) und $5.5 \text{ }\mu\text{M}$ 2-ME (2-Mercaptoethanol) untersucht. Bis auf 2-ME, das in den eigenen Experimenten nicht eingesetzt wurde, wich nur die Transferrinkonzentration ab, die in den eigenen Experimenten ein Viertel der von Yao und Mitarbeitern eingesetzten Konzentration entsprach (Yao et al., 2004). Yao und Mitarbeiter haben herausgearbeitet, dass eine Kombination aus lediglich BSA und Insulin nahezu die gleiche stimulierende Wirkung auf die Expansion der Gesamtzellzahl und die Zahl CD34^+ -Zellen, wie die Kombination aus allen Faktoren. Eine mögliche Lösung der Serumproblematik stellt die Verwendung von autologem Serum dar. Stute und Mitarbeiter vergleichen 2005 in ihren Arbeiten zur Isolation und Expansion von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) für die klinische Verwendung die wachstumsunterstützende Wirkung von 1, 3 und 10% autologem Serums gegenüber dem Standardzusatz von 10% fötalem Kälberserum. Sie konnten zeigen, dass 10% autologes Serum hinsichtlich der Expansion von MSC absolute vergleichbar ist, wobei 1 und 3% deutliche schlechtere Ergebnisse zeigten (Stute et al., 2004). Für die osteogene Differenzierung erschien autologes Serum dem Kälberserum sogar überlegen.

3.8 *Konditionierte Zellkulturüberstände*

Ziel dieser Untersuchung war es, die Eignung unterschiedlicher Zellsysteme für Kokultivierungen mit hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zu analysieren. Um die submerse Kultivierung im Bioreaktor mit den Vorteilen konditionierter Zellkulturüberstände verbinden zu können, wurde besonderes Augenmerk auf die Identifizierung geeigneter Partner für zellkontaktfreie Kokultivierungsstrategien gelegt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Typen von Primärzellen untersucht, die im Mikromilieu der Stammzelle wichtige Funktionen übernehmen. Erweitert wurde diese Auswahl um einige Zelllinien, die ebenfalls aus Knochenmark oder Knochengewebe verschiedener Säugetierspezies stammen.

In Tabelle 1.4 in Abschnitt 1.4.4.4 ist eine Übersicht der in der Literatur beschriebenen kontaktfreien und Zell-Zell-interagierenden zellulären Kokultivierungssysteme zusammengestellt. Die besten Ergebnisse wurden sicherlich mit Knochenmarkfibroblasten erzielt. Allerdings wurden für die Kultur mit direktem Zell-Zell-Kontakt keine praktikablen Lösungen für die technische Umsetzung der

Zellernte entwickelt. Probleme bei der Abtrennung der Zielzellen von den Begleitzellen entstehen im Rahmen komplett autologer Strategien nicht. Die Erfolge der zellkontaktfreien Kultur waren zwar hinsichtlich der Expansion begrenzt, ließen sich technisch aber deutlich leichter umsetzen.

Die entwickelte Strategie sah zunächst die Aufreinigung löslicher Faktoren mit hämatopoetischer Aktivität vor. Im Anschluss wurden die konzentrierten Zellkulturüberstände in Expansionskulturen von CD34⁺-Zellen untersucht.

3.8.1 Etablierung der zellulären Konditionierungssysteme

Zu Beginn dieses Arbeitsabschnittes stand die Isolierung bzw. Etablierung der primären Zelltypen, wie humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (*engl.* Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) und humanen Knochenmarkfibroblasten (hum. KMF bzw. humanes primäres Knochenmarkstroma). Die Kulturmedien für diese beiden Zelltypen stellten das Ergebnis eines eigenen Entwicklungsprozesses dar. Es wurden kryokonservierte Zellbanken etabliert, um standardisiertes Zellmaterial verwenden zu können. Da zu vermuten war, dass individuelle HUVEC-Isolierungen kein einheitliches Potential hinsichtlich der Unterstützung der Expansion von humanen Stamm- und Vorläuferzellen zeigten, wurde ein Pool von 10 Isolierungen erzeugt. Die HUVECs wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Böldicke, Abt. Genregulation und Differenzierung der GBF phänotypisch hinsichtlich CD34-, KDR- und von-Willebrand-Faktor-Expression charakterisiert (Böldicke et. al., 2001). Zur Gewinnung humaner Knochenmarkfibroblasten wurden unterschiedliche Passagen eines Knochenmarkaspirates verwendet. Zu je einem Drittel wurden Zellen der 2. bis 4. Passage verwendet. Die primären Knochenmarkfibroblasten stellten den Anteil des Knochenmarks dar, der sich mittels Kultivierung der adhärenenten Zellfraktion isolieren ließ. Mittels Sudan-III-Färbung wurden die Fähigkeit zur endogenen Bildung von Adipozyten und damit der mesenchymale Charakter und die Fähigkeit der Zellen zur Differenzierung nachgewiesen. Die Zelllinien C3H10/T1/2, M2-10B4, SAOS-2 und 5637, wurden von den angegebenen Quellen bezogen und deshalb als charakterisiert betrachtet.

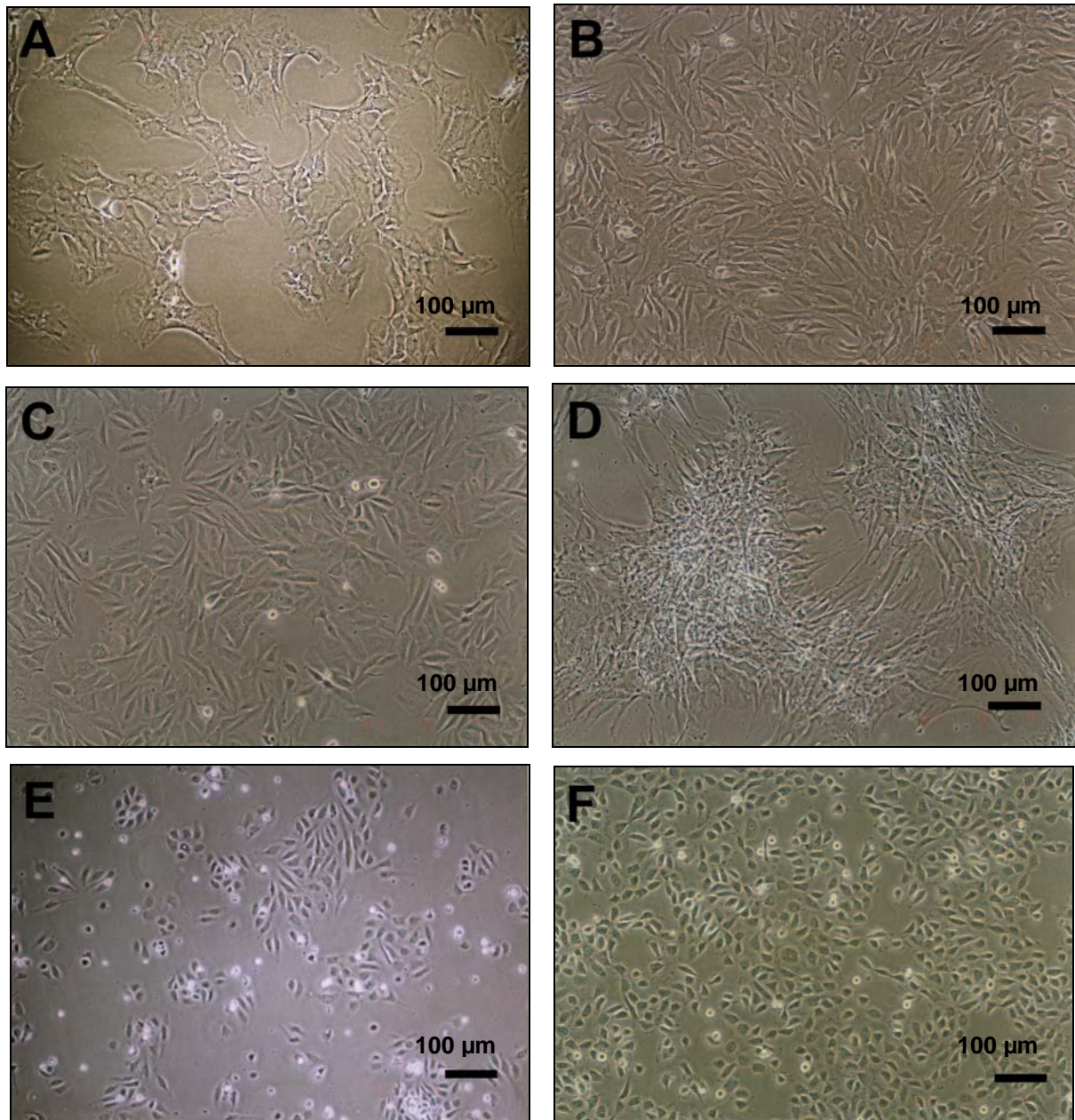


Abbildung 3.26: Morphologie zur Medienkonditionierung eingesetzter zellulärer Systeme: M2-10B4 (A), C3H10T1/2 (B), SAOS-2 (C), primäre humane Knochenmarkfibroblasten (D), primäre HUVEC (E) und 5637 (F).

3.8.2 Herstellung und Einsatz der Konzentrate

Die Herstellung der Konzentrate ist in Abschnitt 2.3.9.1 beschrieben. Bedingt durch das konstruktiv vorgegebene Residualvolumen der Zentrifugalkonzentratoren in Höhe von 0,5 mL wurden die Überstände auf Volumina von 1 bis 2 mL reduziert. Der exakte Konzentrationsfaktor wurde gravimetrisch bestimmt. Der Einsatz der Konzentrate erfolgte nach Rückverdünnung auf die ursprüngliche Konzentration.

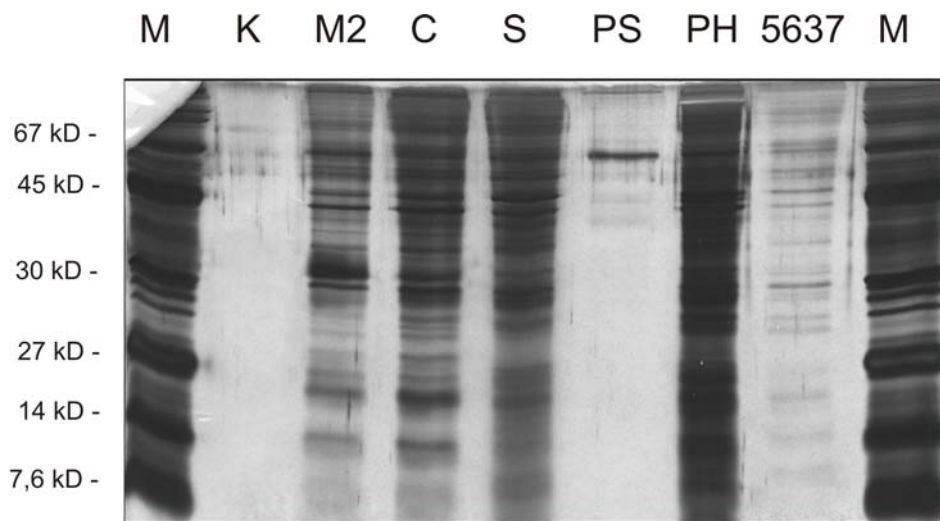


Abbildung 3.27: SDS-PAGE (15%) Analyse (Silberfärbung) der Konzentrate (Konzentrationsmembran: YM-30, Amicon) unter denaturierenden Bedingungen (M: Molekulargewichtsmarker; K: Kontrolle (nur Medium); M2: M2-10B4; C: C3H10T1/2; S: SAOS-2; PS: primäres Stroma bzw. Knochenmarkfibroblasten; PH: primäre HUVEC; 5637: 5637-Zelllinie)

Es wurde 20 µL Konzentrat und damit ein einheitliches Volumen je Probe auf das Gel aufgetragen. Eine quantitative Proteinbestimmung wurde nicht durchgeführt. Die Kontrolle bestehend aus IMDM-Medium zeigte keinerlei nachweisbare Proteine. Die höchste Proteinkonzentration scheint das PH-konditionierte Medium besitzen. Die Gruppe aus M2-, C-, S-konditionierten Medien zeigte eine geringere Proteinmenge, aber höher als der PS- und 5637-konditionierte Überstand.

3.8.3 Konditionierten Zellkulturüberstände

3.8.3.1 Voruntersuchung der konditionierten Zellkulturüberstände

Ziel der Voruntersuchung war die Abschätzung des relativen mitogenen Effektes der sekretierten Faktoren in den konditionierten Überständen (*engl.* conditioned media, CM) auf periphere Blutstammzellen. Dazu wurden diese zunächst im Rahmen eines Mikrotiter-Assays (WST-1-Test) untersucht, der mit Zellzahl und Zellvitalität korrelierbar ist. Der relativen mitogenen Effekte der einzelnen konditionierten Überstände wurden relativ zum Basissignal der Kontrolle in Prozent berechnet. Das Basissignal der Kontrolle wurde mit 0% definiert.

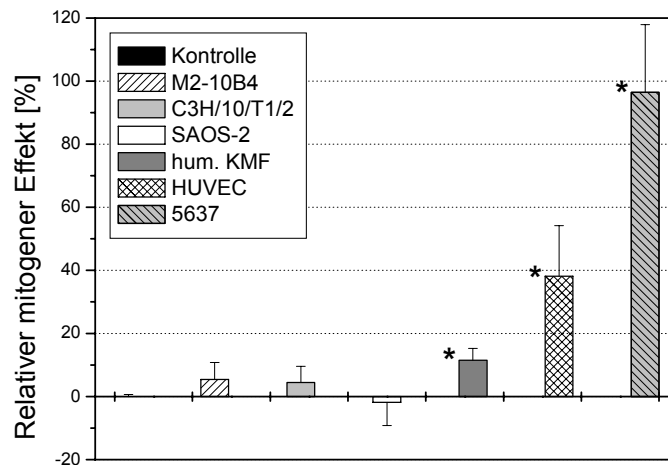


Abbildung 3.28: Einfluss verschiedener konditionierter Überstände auf die Proliferation und Vitalität isolierter peripherer CD34⁺-Blutstammzellen (n=3). Die hergestellten Konzentrate wurden für den Einsatz auf die ursprüngliche Konzentration im konditionierten Überstand zurück verdünnt. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit „*“ gekennzeichnet (p=0,05, Student's t-Test für unverbundene Stichproben).

Die Kulturen wurden in 96-Lochplatten mit einem Kulturvolumen von 120 μL durchgeführt und mit einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ CD34⁺-Zellen mL^{-1} inokuliert. Der Anteil der CD34⁺-Zellpopulation im Inokulum betrug mehr als 95%. Dem Grundmedium (Kontrolle) wurden humanes AB-Serum (2%), 50 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ Penicillin, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Streptomycin, 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hydrocortison und Wachstumsfaktoren zugesetzt: 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ SCF, 25 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL-3 und 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ Flt-3 Ligand. Die Ergebnisse des Vorversuchs sind in Abb. 3.28 aufgetragen. Den mit Abstand stärksten positiven Effekt zeigte der Ansatz mit 5637-konditioniertem Medium ($96 \pm 21\%$). Dem Ergebnis folgten mit $38 \pm 16\%$ das HUVEC-Medium und das mit humanen Knochenmarkfibroblasten konditionierte Medium ($12 \pm 4\%$). Alle anderen konditionierten Überstände waren nicht geeignet, eine signifikante Steigerung hervorzurufen.

3.8.3.2 Kultur von CD34⁺-Zellen mit konditionierten Zellkulturüberständen

Auf der Basis der im vorangehenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse sollten die mitogenen Effekte bzgl. Zellproliferation bestätigt und der Einfluss auf zelluläre Differenzierung analysiert werden.

Dazu wurden Kulturen in 24-Loch-Zellkulturplatten mit einem Kulturvolumen von 1,5 mL durchgeführt und mit einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ CD34⁺ mL⁻¹ inokuliert. Der Anteil der CD34⁺-Zellpopulation im Inokulum betrug 47%. Für die Zellanalytik wurden repräsentative Parallelansätze nach 72, 120, 192 und 312 h geerntet. Dem Grundmedium StemSpan SFM (Kontrolle) wurden 1% humanes AB-Serum, 50 U·mL⁻¹ Penicillin, 50 µg·mL⁻¹ Streptomycin und 1 µmol·L⁻¹ Hydrocortison sowie folgende Wachstumsfaktoren zugesetzt: 50 ng·mL⁻¹ SCF, 25 ng·mL⁻¹ IL-3 und 50 ng·mL⁻¹ Flt-3 Ligand.

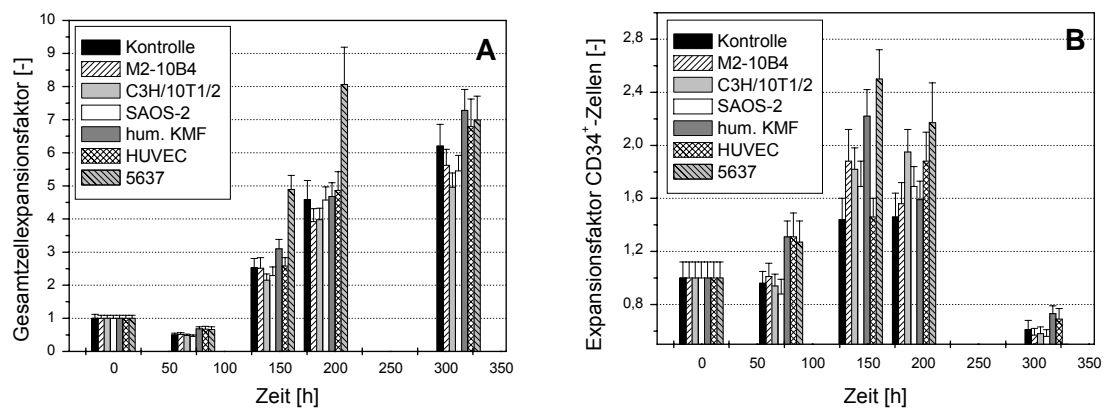


Abbildung 3.29: Einfluss der konditionierten Medien auf den zeitlichen Verlauf der Gesamtzellexpansion (A) und den Expansionsfaktor CD34⁺-Zellen (B). Die hergestellten Konzentrate wurden für den Einsatz auf die ursprüngliche einfache Konzentration im konditionierten Überstand zurück verdünnt.

Die Ergebnisse des zeitlichen Verlaufs der Gesamtzellproliferation sind in Abbildung 3.29. dargestellt. Man erkennt, dass innerhalb der ersten 72 h Kultur in allen Ansätzen ein Rückgang der Gesamtzellkonzentration um fast 50% zu verzeichnen war. Alle Ansätze mit Ausnahme des 5637-Ansatzes (192 h: 8-fach, $p=0,025$ zur Kontrolle) zeigten nach 312 h die maximale Expansion. Deutlich über dem Ergebnis der Kontrolle lagen am Ende der Kultur die Ansätze humane KMF ($7,3 \pm 0,6$ -fach, $p=0,23$), HUVEC ($6,8 \pm 0,8$ -fach, $p=0,6$) und 5637 ($7 \pm 0,7$ -fach, $p=0,43$). Unter dem Ergebnis der Kontrolle lagen die Ansätze C3H/10/T1/2 ($4,7 \pm 0,4$ -fach, $p=0,089$), SAOS-2 ($5,4 \pm 0,5$ -fach, $p=0,277$) und M2-10B4 ($5,6 \pm 0,4$ -fach, $p=0,406$) zeigten ein im Vergleich zur Kontrolle nahezu identisches Ergebnis.

Der zeitliche Verlauf der CD34-positiven Zellen über die Zeit ist in Abbildung 3.29 B. gezeigt. Die Analyse zeigte für alle Ansätze ein Maximum zwischen 144 und 192 h. Danach gingen die CD34-Gehalte aller Ansätze unter das Ausgangsniveau zurück.

Während die Kontrollkultur einen maximalen Wert von 1,4-fach nach 192 h erreichte, konnten alle anderen Ansätze bessere Ergebnisse erzielen. Die Höchstwerte wurden für hum. Knochenmarkfibroblasten ($2,2 \pm 0,2$ -fach, $p=0,028$) und 5637 ($2,5 \pm 0,2$ -fach, $p=0,01$) bestimmt.

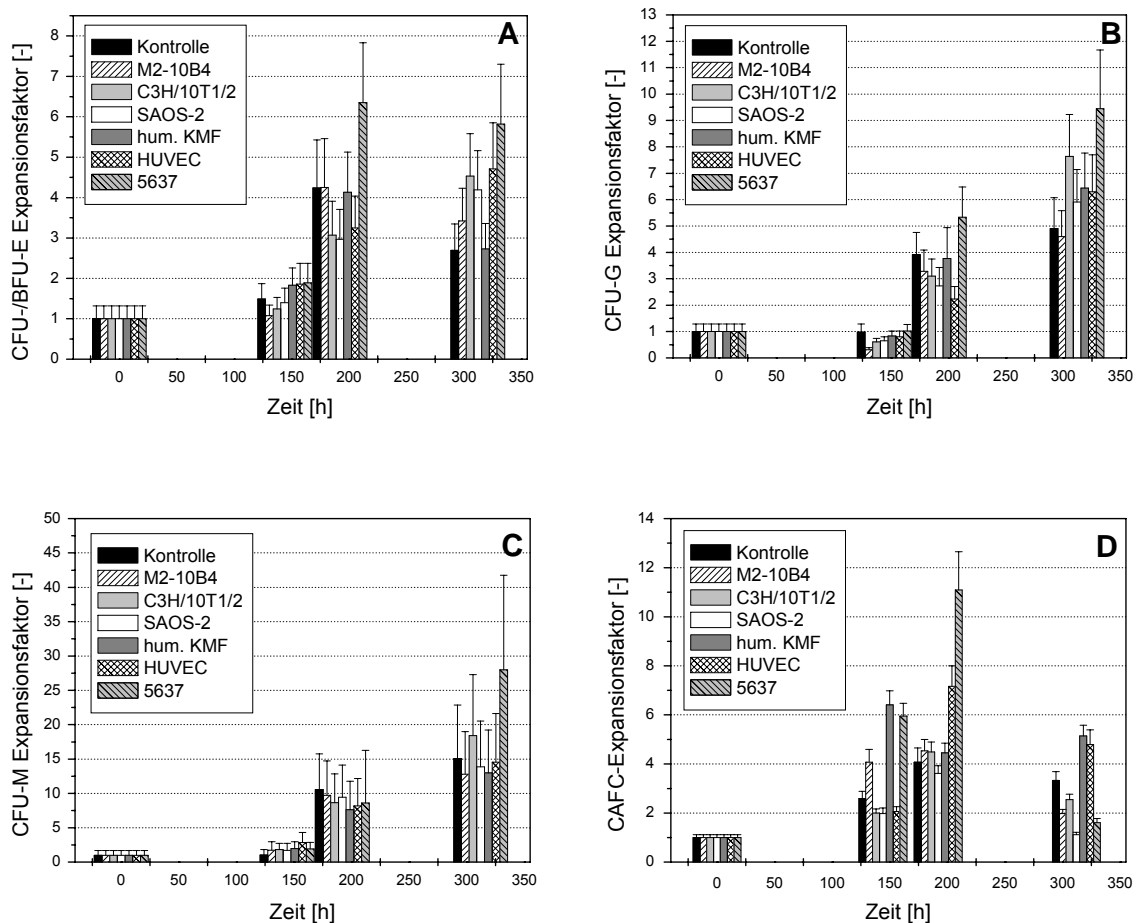


Abbildung 3.30: Einfluss der konditionierten Medien auf den zeitlichen Verlauf der erythrozytären (A), granulozytären (B), monozytären (C) Vorläuferzellen und CAFC (D).

Die Verläufe der linienspezifischen Vorläuferzellen und der CAFC sind in Abbildung 3.30 A bis D dargestellt. Während nach 192 h nur der Ansatz 5637 für die erythrozytären Vorläuferzellen eine stärkere Expansion von $6,4 \pm 1,3$ -fach ($p=0,2$) als die entsprechende Kontrolle aufwies, zeigten zum Ende der Kultur alle Ansätze außer hum. KMF höhere Expansionsfaktoren. Für die granulozytären Vorläuferzellen zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Während nach 192 h alle Ansätze mit $3,9 \pm 0,9$ im Bereich der Kontrolle lagen, konnten nach 312 h in allen Ansätzen außer M2-10B4 höhere Expansionsfaktoren bestimmt werden. Die stärkste Expansion konnte für den 5637-Ansatz mit 9,5-fach ($p=0,075$) ermittelt werden. Das Ergebnis der monozytären

Vorläufer wies lediglich für den 5637-Ansatz (28 ± 13 -fach, $p=0,37$) einen relativ zur Kontrolle höheren Expansionsfaktor nach 312 h Kultur auf. An allen anderen Tagen konnten keine erkennbar abweichenden Werte bestimmt werden. Die Analyse der CAFC-Konzentrationen und daraus resultierenden Expansionsfaktoren zeigte für fast alle Ansätze die maximalen Werte nach 192 h der Kultivierung. Eine Ausnahme bildete der hum. KMF-Ansatz. Nur der genannte Ansatz M2-10B4 und die Ansätze HUVEC mit 7,2-fach ($p=0,026$) und 5637 mit 11,1-fach ($p=0,009$) konnten nach 192 h höhere Werte als der entsprechende Kontrollwert erzielen. Nach 312 h gingen schließlich alle Ansätze auf Werte zwischen 5,4-facher (hum. KMF) und 2,6-facher Expansion der CAFC zurück.

Die messbaren Effekte der hergestellten konditionierten Medien blieben bis auf die mit der Zelllinie 5637 hergestellten hinter den Erwartungen zurück. In der Literatur (Abschnitt 1.4.4.4) werden mit Transwell-Kokulturen deutlichere Effekte beschrieben. So konnte Verfaillie in 2-wöchigen zellkontaktfreien Kokulturen mit γ -bestrahlten humanen Knochenmarkstromazellen eine 6-fache Expansion der erythrozytären, granulozytären und monozytären Vorläuferzellen nachweisen (Verfaillie, 1992). Andere Autoren, die ebenfalls γ -bestrahlte humane Knochenmarkstromazellen einsetzten, konnten gerade in Kombination mit der zusätzlichen Gabe von Wachstumsfaktoren noch deutlichere Effekte nachweisen (Yamaguchi et al., 2001; Bhatia et al., 1997). Für den Einsatz von mikrovaskulären Knochenmarkendothelzellen in Transwell-Experimenten konnten Rafii und Mitarbeiter eindeutig eine Langzeiterhaltung myeloischer und megakaryozytärer Vorläuferzellen über 42 Tage demonstrieren (Rafii et al., 1995). Chute und Mitarbeiter konnten unter Verwendung von HUBEC (humane brain endothelial cells) in Transwell-Experimenten (0,4 μ m Filter) unter Zugabe von TPO, Flt-3 Ligand und SCF eindeutig einen positiven Einfluss auf die Expansion von CD34⁺-Zellen. Auch die Autoren, die Stromazelllinien wie M2-10B4 oder HS-5 verwendeten, konnten deutlichere Effekte beschreiben (Burroughs et al., 1994; Kanai et al., 2000; Goerner et al., 2000). Lediglich die Effekte der 5637-konditionierten Überstände waren hinsichtlich fast aller untersuchten Parameter signifikant. 5637 ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden eine Reihe von Wachstumsfaktoren in hohen Konzentrationen zu sezernieren, und wurde aus diesem Grund als Positivkontrolle eingesetzt (siehe Abschnitt 2.1.6). Zur Erklärung der wenig ausgeprägten Effekte sind folgende Überlegungen anzuführen:

1. Es war zu erwarten, dass ohne die Zugabe von Serum der Einfluss deutlicher hervorgetreten sein sollte. Der Gehalt wurde bewusst auf 1% gepooltes AB-Serum reduziert, aber wie die Ergebnisse in Abschnitt 3.7 zeigen, war selbst auch diese niedrige Konzentration geeignet die Proliferation zu unterstützen.
2. Eine teilweise Reduktion der Konzentration oder sogar Eliminierung der zugesetzten Wachstumsfaktoren (hier: SCF, IL-3, Flt-3 Ligand) sollte die Effekte der konditionierten Überstände ebenfalls stärker hervortreten lassen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Davis und Mitarbeiter, die Kulturen CD34⁺-Zellen sowohl Wachstumsfaktoren als auch konditionierte Zellkulturüberstände von primären, mikrovaskulären Schweineendothelzellen zusetzten. Sie konnten aber darüber hinaus auch zeigen, dass trotz Supplementierung des Mediums mit SCF, EPO, IL-3 und GM-CSF die Zugabe von konditioniertem Medium einen zusätzlichen stimulatorischen Effekt hat (Davis et al., 1997a;b).
3. Wiederholte Einfrier- und Auftauvorgänge haben einen negativen Einfluss auf die biologische Aktivität von Proteinen. Im Rahmen der Herstellung war es notwendig die gewonnenen Zellkulturüberstände bis zur ihrer Verwendung bei -20° C zu lagern (siehe Abschnitt 2.3.9.1). Da diese auf die Ausgangskonzentration zum Einsatz zurück verdünnt wurden, wurde der vermutete Aktivitätsverlust nicht kompensiert. Die Überstände lagen nach der Aufarbeitung in bis zu 15-facher Konzentration vor.

Vor dem Hintergrund einer möglichen klinischen Anwendbarkeit kommt lediglich die Kokultur mit Knochenmarkfibroblasten und Endothelzellen, beides isoliert aus autologem humanem Knochenmark, in Frage. Diese lassen sich mit vertretbarem Aufwand autolog, falls notwendig auch allogon gewinnen und nach mehrfach publizierten Methoden in Kultur bringen. Unter diesen Voraussetzungen käme auch eine Kokultur mit Zell-Zell-Kontakt in Frage, die nach dem aktuellen allgemeinen Kenntnisstand die besten Ergebnisse hinsichtlich Erhaltung des Stammzellcharakters zeigt, da sie dem Mikromilieu der Stamm- und Vorläuferzellen am nächsten kommt. Die Identifikation stimulatorisch wirksamen Substanzen war nicht das primäre Ziel dieser Arbeit. Prinzipiell können über die Generierung von Zellkulturüberständen und die proteinbiochemische Analyse weitere stimulatorische oder inhibierende Faktoren isoliert und identifiziert werden. Gupta et al. haben dazu grundlegende Untersuchungen auf der Basis einer chromatografischen Trennung Stromazell-sekretierter Proteine durchgeführt und unter anderem Heparansulfat als essenziellen Faktor identifiziert (Gupta et al., 1996).

3.9 Einfluss allgemeiner Kulturparameter auf die Expansion

3.9.1 Einfluss der Ausgangszellkonzentration

Die Ausgangszellkonzentration kann entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis einer Kultivierung nehmen (Paquette et al., 2002; Zech et al., 2003). Es ist nicht unbedingt davon auszugehen, dass diese für jede Quelle, z. B. Knochenmark oder Nabelschnurblut, von Stamm- und Vorläuferzellen identisch ist. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten peripheren Blutstammzellen wurden 4 parallele Kulturen in 24-Loch-Zellkulturplatten mit einem Kulturvolumen von 1,5 mL je Vertiefung durchgeführt und mit einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$ und $5 \cdot 10^5$ CD34⁺ mL⁻¹ inokuliert.

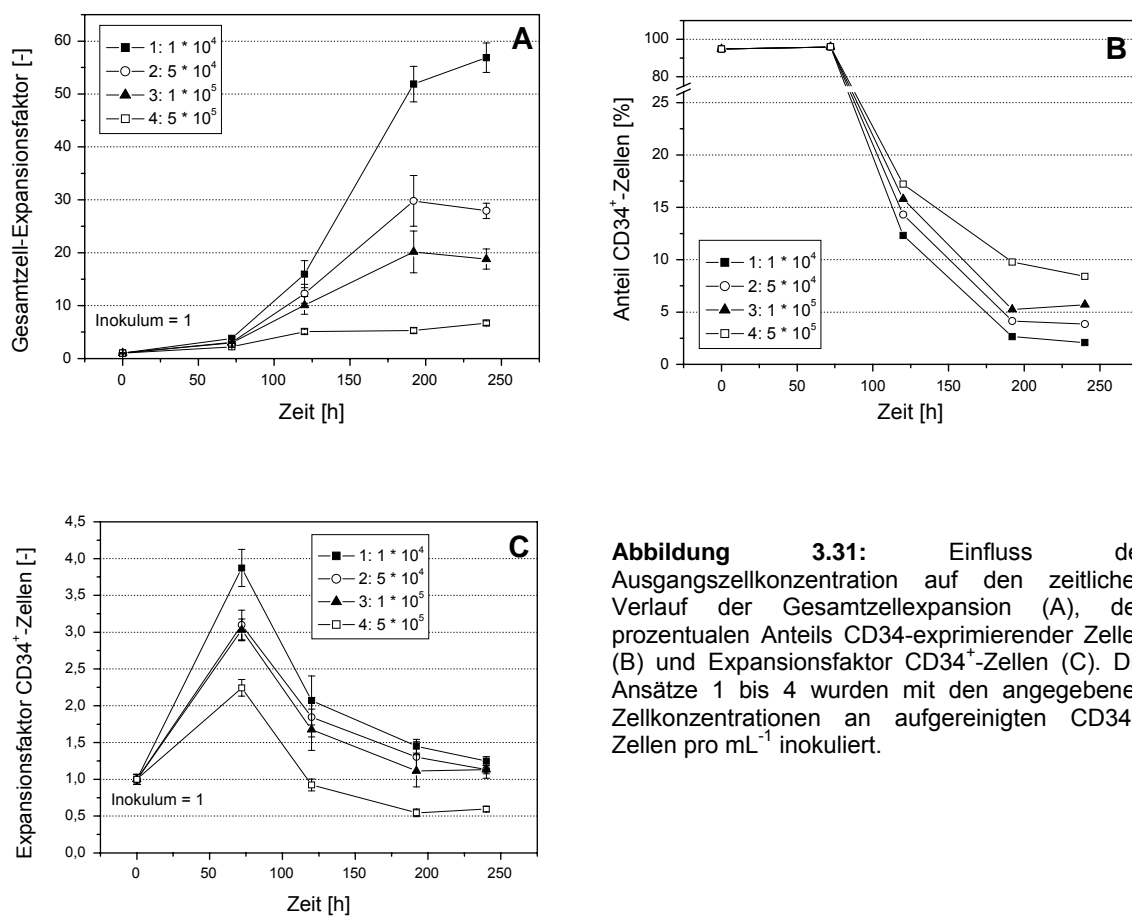


Abbildung 3.31: Einfluss der Ausgangszellkonzentration auf den zeitlichen Verlauf der Gesamtzellexpansion (A), des prozentualen Anteils CD34-exprimierender Zellen (B) und Expansionsfaktor CD34⁺-Zellen (C). Die Ansätze 1 bis 4 wurden mit den angegebenen Zellkonzentrationen an aufgereinigten CD34⁺-Zellen pro mL⁻¹ inokuliert.

Der Anteil der CD34⁺-Zellpopulation im Inokulum betrug mehr als 95%. Für die Zellanalytik wurden repräsentative Parallelansätze nach 72, 120, 192 und 240 h Kultur geerntet. Dem Grundmedium StemSpan SFM wurden 2% humanes AB-Serum, 50 U·mL⁻¹ Penicillin, 50 µg·mL⁻¹ Streptomycin, 1 µmol·L⁻¹ Hydrocortison sowie folgende Wachstumsfaktoren zugesetzt: 50 ng·mL⁻¹ SCF, 25 ng·mL⁻¹ IL-3 und 50 ng·mL⁻¹ Flt-3 Ligand.

Der Einfluss der Ausgangszellkonzentration, hier aufgrund des hohen Anteils an CD34-positiven Zellen nahezu gleichbedeutend mit der Konzentration CD34-positiver Zellen, auf die zeitliche Entwicklung der Gesamtzellexpansion ist in Abbildung 3.31 A dargestellt. Für die vier untersuchten Ausgangszellkonzentrationen galt, je höher die Zellkonzentration desto niedriger war der resultierende Expansionsfaktor. Alle Zellkulturansätze wuchsen kontinuierlich über 240 h bis die Kulturen in einen quasistationären Bereich eintraten. Ansatz 1 mit der niedrigsten Zellkonzentration erreichte die höchsten Expansionsfaktoren von $52 \pm 3,3$ ($p_{1-2}=0,008$) nach 192 h bzw. 56 ± 3 nach 240 h ($p_{1-2}<0,05$). Ansatz 4 zeigte zu jedem Versuchstag die geringste Expansion. Der Unterschied zwischen Ansatz 2 und 3 erreichte erst nach 240 h statistische Signifikanz ($p=0,009$). Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der CD34-Expression zeigte, dass je höher die anfängliche Zellkonzentration war, desto langsamer schritt die Differenzierung, phänotypisch anhand der CD34-Expression bestimmt, voran. Diese Beobachtung galt für den gesamten Kulturverlauf. Da die Ansätze mit niedrigen Ausgangszellkonzentrationen eine stärkere Proliferation zeigten, war die Analyse der Expansionsfaktoren CD34⁺-Zellen für die Aussage, welcher Ansatz Zellen mit Stammzellcharakter besser unterstützt, entscheidend. Es lies sich rechnerisch bestimmen, dass der höchste Expansionsfaktor, trotz schnellerer und weiter fortschreitender Differenzierung, in dem Ansatz mit der niedrigsten Ausgangszellkonzentration zu finden war. Je niedriger die Ausgangszellkonzentration war, desto höher war auch der Expansionsfaktor der CD34⁺-Zellen. Alle Ansätze zeigten denselben zeitlichen Verlauf. Nach 72 h erreichte die Zahl CD34-positiver Zellen in allen Ansätzen ihren maximalen Wert, anschließend sank diese bis 240 h Kultur kontinuierlich ab. In Ansatz 1 konnte nach 72 h der maximale Expansionsfaktor von 3,9-fach ($p_{1-2,3}<0,034$) bestimmt werden. Ansatz 4, mit der höchsten Ausgangszellkonzentration von $5 \cdot 10^5$ mL⁻¹, erreichte nur 2,2-fach und lag damit ebenfalls statistisch signifikant unter den Ansätzen 2 und 3 ($p<0,005$).

Die Analyse der linienspezifischen Vorläufer und der unreiferen CAFC sollte einen weiteren entscheidenden Hinweis liefern, welche Ausgangszellkonzentration im Hinblick auf eine maximale Expansion reifer und früher Stamm- und Vorläuferzellen die besten Resultate liefern würde. Die Ergebnisse der zeitlichen Verläufe der erythrozytären, granulozytären und monozytären Vorläuferzellen sowie früher Vorläufer, wie den CAFC, ist in den Abbildungen 3.32 A bis D gezeigt. Der zeitliche Verlauf der erythrozytären Vorläufer ähnelte prinzipiell dem Verlauf der Expansionsfaktoren der CD34⁺-Zellen. Die höchsten Werte wurden nach 72 bzw. 120 h erreicht, wobei die Ergebnisse von Ansatz 1 immer über allen anderen und die von Ansatz 4 immer unterhalb der anderen lagen. Danach nahmen die Werte kontinuierlich bis nach 240 h Kultur ab. Ansatz 1 erreichte den höchsten Wert nach 72 h mit 10,9±1,4-fach ($p<0,021$) und lag damit signifikant über allen anderen. Am letzten Kulturtag, nach 240 h, lagen die Werte von Ansatz 1 und 2 mit 3,4±0,4-fach ($p_{1-4}=0,004$); 1,4±0,17-fach ($p_{2-4}=0,005$) über dem Inokulum und signifikant über Ansatz 4. Ansatz 3 konnten den Wert des Inokulums erhalten und Ansatz 4 lag mit 40% darunter. Der Verlauf der CFU-G-Expansionsfaktoren zeigte an anderes Bild. Der höchste Wert konnte abermals von Ansatz 1 nach 72 h mit 7±1,9-fach ($p_{1-4}=0,049$) erreicht werden. Dieser Wert lag zwar deutlich über Ansatz 2 und 3, aber ein signifikanter Unterschied konnte nur relativ zu Ansatz 4 berechnet werden. Danach ging der Expansionsfaktor auf ein Niveau um 1,8- bis 4,8-fach zurück und blieb dort bis zum Ende des betrachteten Zeitraums. Die monozytären Vorläufer zeigten einen vergleichbaren Verlauf. In Ansatz 1 konnte nach 72 h der höchste Wert mit 6,4±2,3-fach ($p_{1-2,3,4}>0,171$) bestimmt werden. Danach sanken die Werte aller Ansätze auf ein Niveau zwischen 1,1- und 3,3-fach. Vergleichbar mit dem Ergebnis der granulozytären Vorläufer konnten auch hier keine weiteren statistisch signifikanten Ergebnisse mehr bestimmt werden, auch wenn Ansatz 4 an nach 192 und 240 h Kultur niedriger zu liegen scheint. Da für die CAFC an späten Kulturtagen keine vollständigen Datensätze ($n=3$) gesammelt werden konnten, wurde lediglich ein Betrachtungszeitraum von 120 h dargestellt. Eine Analyse der CAFC ergab innerhalb der ersten 72 h in allen Ansätzen eine Expansion. Ansatz 1 erreichte eine 2,5±0,2-fache Expansion, Ansatz 2 und 3 eine 1,8-fache ($p_{1-2}=0,015$) bzw. 2,1-fache ($p_{1-3}=0,091$) und Ansatz 4 eine 2,2-fache ($p_{1-4}=0,124$) Expansion des frühen, unreifen Vorläuferzelltyps. Bis zu 120 h Kultur sanken die CAFC-Konzentrationen in allen

Ansätzen wieder auf das Ausgangsniveau und es waren keine signifikanten Unterschiede berechenbar.

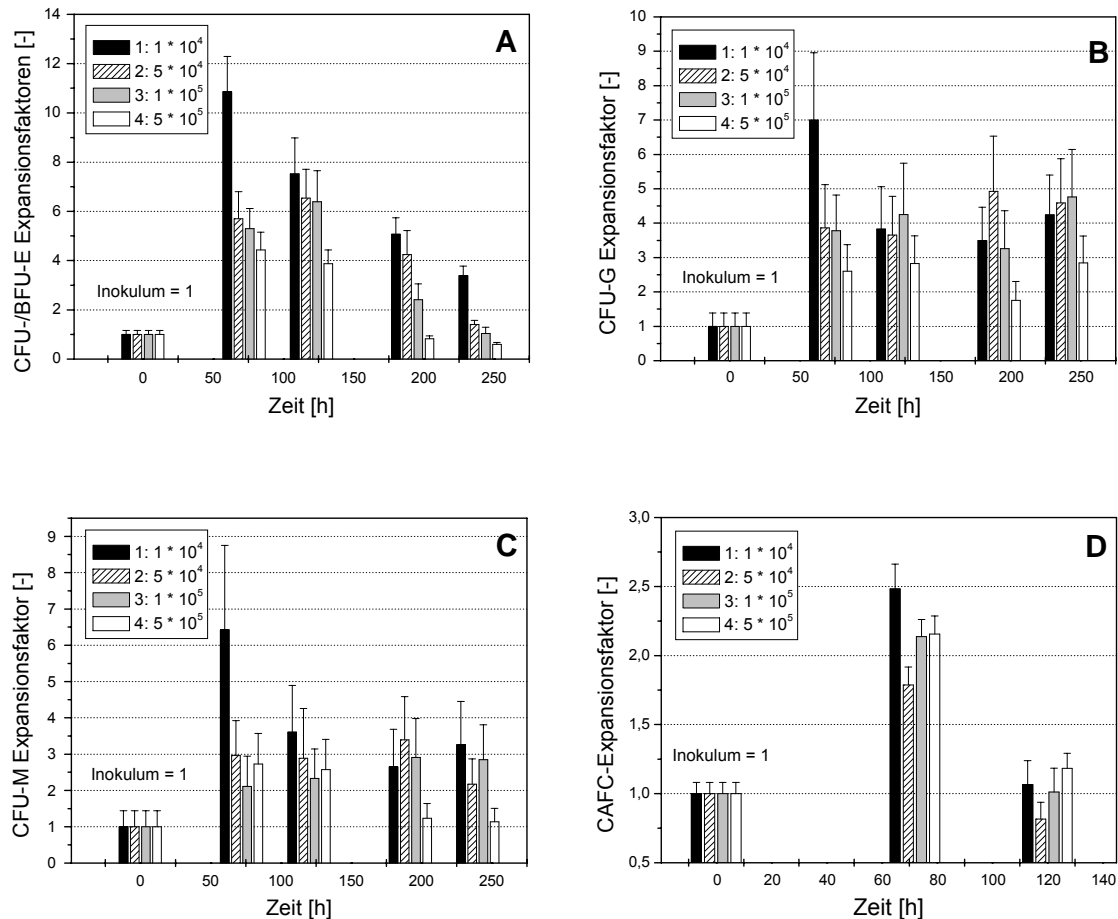


Abbildung 3.32: Einfluss der Ausgangszellkonzentration [mL^{-1}] auf den zeitlichen Verlauf der erythrozytären (A), granulozytären (B), monozytären (C) Vorläuferzellen und CAFC (D).

Die Ausgangszellkonzentration hat einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis einer Kultivierung. Für die Ausgangszellkonzentrationen aufgereinigter CD34^+ -Zellen galt, je höher die Zellkonzentration desto niedriger der resultierende Expansionsfaktor. Dieses Ergebnis galt für alle untersuchten zellulären Subpopulationen. Paquette und Mitarbeiter haben durch die Kultur von mobilisierten peripheren Blutstammzellen gezeigt, dass eine Erhöhung der Ausgangszelldichte zu einer Verringerung der Gesamtzellausbeute und Gesamtzellexpansion führt (Paquette et al., 2002). Höhere Expansionsraten von LTC-IC aus CD34 -positiven und CD38 -negativen Zellen konnten auch bei Zech et al. bei geringeren Startzelldichten von 2 bis $5 \cdot 10^3$ Zellen mL^{-1} nachweisen (Zech et al., 2003). Der Aufrechterhaltung der Homöostase kommt im Organismus eine zentrale Funktion zu.

Die eigenen sowie die dazu publizierten Ergebnisse sind im Einklang mit der zu beobachtenden Neubesiedlung des Knochenmarks nach Knochenmarkentnahme. Stamm- und Vorläuferzellen sowie Stromazellen werden bei Bedarf aus dem residualen Pool heraus gebildet. Wodurch dieses Bedarfssignal vermittelt wird, ist bis dato nicht bekannt. Anzunehmen ist jedoch, dass es sich sowohl um lösliche Faktoren als auch durch direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelte Signale handelt. Ist die Zelldichte und –zusammensetzung wieder normalisiert, verringert sich demnach die Zellproliferation und die Regeneration kommt zum Erliegen. Die Suspensionskultur stellt eine Herauslösung aus dem Zellverband des Gewebes dar und könnte an sich ein Regenerationssignal erzeugen. Bei höheren Zelldichten allerdings, im untersuchten Bereich von 1 bis $5 \cdot 10^5$ CD34⁺-Zellen mL⁻¹, kann eine die Zellproliferation einsetzende Regulierung und Inhibierung durch sekretierte Faktoren vermutet werden. Die Zelldichte punktierten Knochenmarks beträgt: ca. $1 \cdot 10^7$ nukleäre Zellen pro mL mit einem Anteil von ca. $1 \cdot 10^5$ CD34⁺-Zellen mL⁻¹ (entsprechend ca. 1%). Eine interessante Frage betrifft die Grenzen dieses Prinzips in die andere Richtung. Wie weit können Stamm- und Vorläuferzellen ausgedünnt werden, damit aus einer Reduktion der Zellkonzentration weiterhin eine Erhöhung des Expansionsfaktors resultiert? Parallel besteht die Forderung, dass während der Expansionsphase die Vorläuferzellen ihren Stammzellcharakter nicht verlieren. Der Einsatz eines Bioreaktorsystems im Perfusionsbetrieb, also mit kontinuierlichem Medienaustausch und Zellrückhaltung, sollte das Problem der Akkumulation von inhibitorischen Signalen verringern. Diese Hypothese beinhaltet aber auch zugleich die theoretische Begrenzung, dass man derartige Kulturen nicht über eine maximale Zelldichte hinaus kultivieren kann. Die Frage nach dem Einfluss der Zellrückhaltung und damit Konzentrierung sowie der inhibitorischen Signalvermittlung durch lösliche Faktoren sollte in Abschnitt 3.9.2 weiter behandelt werden.

3.9.2 Einfluss der Kulturführungsstrategie

Die Fütterungsstrategie und die Rückhaltung von Zellen im System haben ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Kultur. Die Hämatopoese findet im Knochenmark unter so genannten quasistationären Bedingungen statt (Koller und Palsson, 1993). Dies beinhaltet die kontinuierliche Versorgung mit frischen Nährstoffen und parallel die Entfernung von Stoffwechselmetaboliten. Es sind in der

Literatur statische Kulturen beschrieben, in denen eine kontinuierliche Medienperfusion bei gleichzeitiger vollständiger Zellrückhaltung durchgeführt wurde. Dabei variierte die Medienperfusion von täglichem Komplettmedium- bis zu einem wöchentlichen Halbmediumwechsel (Koller et al., 1998a; Sandstrom et al., 1995; Koller et al., 1995b).

Ziel dieser Untersuchung war der Vergleich zweier prinzipiell unterschiedlicher Fütterungsstrategien und eines Ansatzes mit und ohne Zellrückhaltung. Dazu wurden dreimal 3 Kulturen in 24-Loch-Zellkulturplatten mit einem Kulturvolumen von 1,5 mL durchgeführt und mit einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ CD34⁺ mL⁻¹ inokuliert. Der Anteil der CD34⁺-Zellpopulation im Inokulum betrug mehr als 95%. Das gemeinsame Ausgangsmaterial aller Ansätze wurde 72 h lang präinkubiert. Anschließend wurde in Ansatz 2 täglich die Hälfte der Zellsuspension abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Ziel war eine tägliche Halbierung der Zellkonzentration. Ansatz 3 wurde wie folgt behandelt: es erfolgte täglich eine vollständige Gewinnung der Zellen. Danach wurden alle gewonnenen Zellen in einer Mischung aus 50% altem und 50% frischem Kulturmedium resuspendiert und anschließend weiter inkubiert. Ziel war der Erhalt der Zellkonzentration bei täglichem Halbmediumwechsel. Ansatz 3 sollte den klassischen Medienperfusionsbetrieb in der Kulturschale simulieren. Ansatz 1 wurde ohne Medienwechsel im Batchbetrieb kultiviert. Die Berechnung des Ansatzes 2 wurde unter der Annahme vorgenommen, dass auch die entnommenen Zellen verdünnt weiterkultiviert würden und sich somit das Kulturvolumen jeden Tag verdoppelte (Prinzip: Fed-Batch-Betrieb). Für die Bestimmung der Gesamtzellexpansionsfaktoren wurden ab 72 h Kultur täglich Proben entnommen. Für die umfangreiche Zellanalytik wurden repräsentative Parallelansätze lediglich nach 72, 120, 168 und 264 h geerntet. Dem Grundmedium StemSpan SFM wurden 2% humanes AB-Serum, 50 U·mL⁻¹ Penicillin, 50 µg·mL⁻¹ Streptomycin und 1 µmol·L⁻¹ Hydrocortison sowie folgende Wachstumsfaktoren zugesetzt: 50 ng·mL⁻¹ SCF, 25 ng·mL⁻¹ IL-3 und 50 ng·mL⁻¹ Flt-3 Ligand.

Der zeitliche Verlauf der Gesamtzellentwicklung ist in Abbildung 3.33 A gezeigt. Ausgehend vom Zeitpunkt des Beginns des Halbmediumwechsels bei 72 h zeigte Ansatz 2 bis zum Ende des betrachteten Zeitraums die jeweils höchsten Expansionsfaktoren und erreichte zum Ende der Kultivierung Werte von 38 ± 7 ($p_{2-3}=0,046$) nach 216 h bzw. 89 ± 13 ($p_{2-3}=0,004$) nach 264 h Kultur. Ein Vergleich der Ansätze 1 und 3 ergab nach 192 h ($p_{1-2}=0,021$) einen leichten Vorteil für Ansatz 1.

Danach gingen die Zellen der Batchkultur (1) in die quasistationäre Phase über, während die Zellen in Ansatz 3 kontinuierlich bis 264 h weiter expandierten.

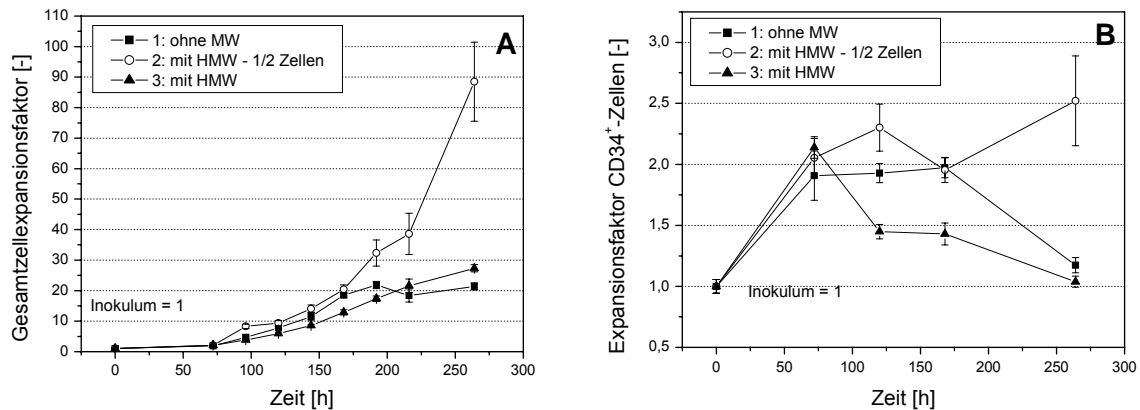


Abbildung 3.33: Einfluss der Kulturführungsstrategie auf den zeitlichen Verlauf der Gesamtzellexpansion (A), des prozentualen Anteils CD34-exprimierender Zellen (B) und Expansionsfaktoren CD34⁺-Zellen (C). Ansatz 1: Satzweise Kultur, Ansatz 2: Täglicher Halbmediumwechsel mit Halbierung der Zellkonzentration, Ansatz 3: Täglicher Halbmediumwechsel mit Erhaltung der Zellzahl.

Die Entwicklung der CD34-positiven Zellen ist in Abbildung 3.33 B dargestellt. Alle Ansätze zeigten eine Verdopplung der Zahl CD34⁺-Zellen innerhalb der ersten 72 h. In Ansatz 3 kam es unmittelbar danach zu einem kontinuierlichen Verlust CD34-positiver Zellen bis auf das Niveau des Inokulums zum Ende der Kultivierung. Die anderen beiden Ansätze 1 und 2 hielten den Expansionsfaktor von 2 bis zu 144 h Kultur aufrecht. Danach sank die Zahl CD34⁺-Zellen in Ansatz 1 ebenfalls auf den Ausgangswert, während in Ansatz 2 nach 264 h das 2,5-fache der Ausgangszellzahl ($p_{1-2}=0,012$) nachzuweisen war. Die Entwicklung der erythrozytären Vorläufer zeigte ausgehend vom Inokulum für die Ansätze 1 und 3 eine kontinuierliche Zunahme dieser Klasse von Zellen und nach 168 h die maximale Expansion (Abb. 3.34 A). Während in Ansatz 2 die Zellen bis auf einen Wert von 9,4-fach nach 264 h weiter expandierten, sanken die Expansionsfaktoren für die anderen beiden bereits ab. Der Verlauf der granulozytären Vorläuferzellen wies keine signifikanten Unterschiede auf und präsentierte ebenfalls für die Ansätze 1 und 3 nach 168 h die maximalen Werte der Expansion (Abb. 3.34 B). Ansatz 1 erreichte dabei den höchsten Wert von $13,7 \pm 3,7$ -fach. Anschließend sanken die Ergebnisse für die Ansätze 1 und 3 ab, während Ansatz 2 wiederum sein Maximum von $10,5 \pm 3,6$ -fach erreichte.

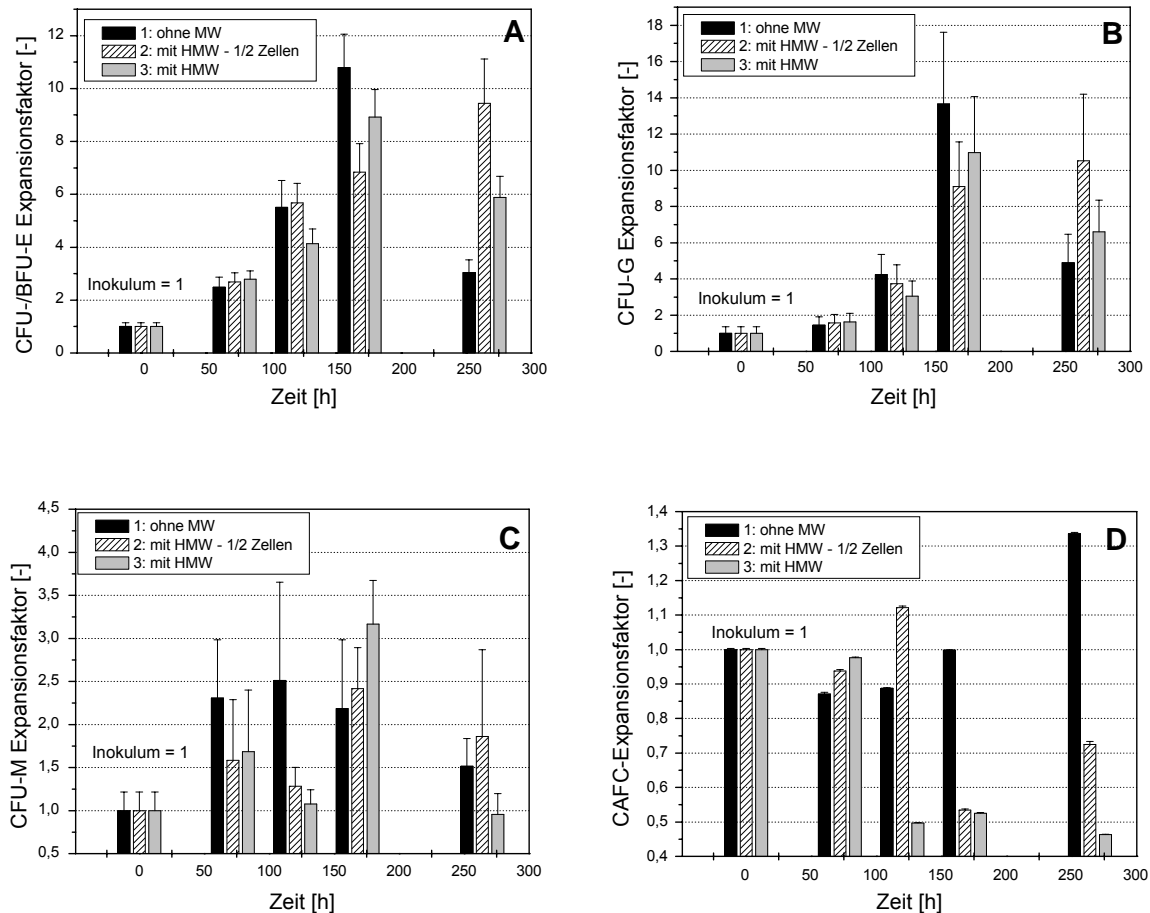


Abbildung 3.34: Einfluss der Kulturführungsstrategie auf den zeitlichen Verlauf der erythrozytären (A), granulozytären (B), monozytären (C) Vorläuferzellen und CAFC (D).

Der Verlauf der monozytären Vorläuferzellen legte einen ähnlichen Trend hinsichtlich des allgemeinen Kulturverlaufs offen (Abb. 3.34 C). Die monozytären Vorläuferzellen in Ansatz 1 wuchsen zwischen 72 und 168 h um den Faktor 2,1 bis 2,5. Die Zellen in den Ansätzen 2 und 3 zeigten eine langsamere Zunahme dieser Klasse von Zellen, erreichten aber nach 168 h ebenfalls Expansionsfaktoren von 2,4 bzw. 3,2. Ansatz 2 war bis 264 h in der Lage einen Gehalt über dem Niveau des Inokulums zu halten ($1,9 \pm 1$ -fach). Im Vergleich dazu erreichte Ansatz 3 nur eine Erhaltung ($0,95 \pm 0,24$ -fach). Der Verlauf der CAFC (Abb. 3.34 D) als Funktion der Zeit offenbarte an den späteren Kulturtagen einen Vorteil für die satzweise Kultur. Während innerhalb der ersten 72 h alle drei Ansätze den CAFC-Gehalt des Inokulums erhalten konnten, sank der Gehalt danach bis 264 h Kultur in Ansatz 3 auf die Hälfte ($0,46$ bis $0,52$ -fach, $p_{1-3} < 0,001$). Auch in Ansatz 2 fiel der CAFC-Gehalt nach 168 h Kultur unter das Ausgangsniveau (168 h: $0,53$ -fach, ($p_{1-2} < 0,001$); 264 h: $0,73$ -fach, ($p_{1-2} < 0,001$)). Nur

Ansatz 1, die satzweise Kultur, war in der Lage den Gehalt an CAFC bis zum Ende des betrachteten Zeitraums aufrecht zu erhalten.

Die Strategie der kontinuierlichen Kulturverdünnung bei gleichzeitigem Halb-Medienwechsel zeigte die mit Abstand stärkste Gesamtzellproliferation. Diese Stimulation wirkte sich auch bis auf die Ebene der frühen Vorläuferzellen aus, die sich bereits nach 264 h Kultur fast völlig erschöpft hatten. Auf der anderen Seite stand die satzweise Kultivierung, die nach 192 h Kultur eine moderate Expansion zeigte, bei weitgehendem Erhalt der CAFC. Die Strategie des Zellerhaltes bei gleichzeitigem Halb-Medienwechsel brachte nicht den erhofften Vorteil. Der Nutzen frischer Nährstoffe machte sich erst an späteren Kulturtagen bemerkbar, zu frühen Zeitpunkten hingegen war der Vorteil der vermuteten Eigenkonditionierung stärker ausgeprägt. Die Ergebnisse entsprechen denen von McNiece und Mitarbeitern. Sie konnten unter Verwendung einer Zwei-Schritt-Strategie, eine stärkere Expansion der Gesamtzellzahl, der linienspezifischen Vorläuferzellen und eines in der vorliegenden Arbeit nicht diskutierten Typs von frühen Stammzellen, den HPP-CFC (High Potential Proliferative-Colony Forming Cell), relativ zur Ein-Schritt-Strategie, provozieren. Die Strategie sah die einmalige Verdünnung der Zellen um den Faktor 10 nach 7 von 14 Kulturtagen in frischem Medium vor (McNiece et al., 2000b). Auch Collins und Mitarbeiter verglichen zwei unterschiedliche Kulturführungsstrategien auf der Basis von mononukleären Zellen aus peripherem und Nabelschnurblut miteinander (Collins et al., 1998b). Das erste Protokoll sah den zweitägigen Halbmediumwechsel unter Erhalt der Zellzahl und Zugabe von frischem Medium vor. Das zweite sah vor die Kultur auf Gesamtzellzahlen um $1 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ durch die Entfernung von 25 bis 45% der Zellsuspension und Ersatz dieser durch frisches Kulturmedium zu verdünnen. Auch hier wurden deutlich bessere Ergebnisse hinsichtlich Gesamtzellexpansion und Expansion von CFU-GM auf der Basis des Protokolls mit Zellausdünnung erreicht. Die Frage nach der Präsenz eines Einflusses einer inhibitorischen Signalvermittlung durch lösliche Faktoren konnte nicht eindeutig beantwortet werden. Eine Inhibierung aufgrund der Limitierung einer Medienkomponente erscheint in Anbetracht der niedrigen Zellkonzentrationen jedoch unwahrscheinlich. Madlambayan und Mitarbeiter haben ebenfalls den Einfluss von dynamischen Änderungen der Kultur untersucht (Madlambayan et al., 2005). Sie untersuchten die Akkumulationsraten von inhibitorischen Faktoren wie MIP-1 α und TGF- β 1 in Kulturen mononukleärer Nabelschnurblutzellen und konnten zeigen, dass innerhalb 8-tägiger Kultur hohe

Konzentrationen akkumuliert werden ($2.300 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF- β 1 und $200 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MIP-1 α). Diese Konzentrationen können signifikant verringert werden, wenn eine regelmäßige Entfernung von reifen „Lineage“-Markern tragenden Zellen durchgeführt wird, die unreifen Zellen jedoch weiter in komplett frischem Medium kultiviert werden.

3.10 *Bioreaktorkultur hämatopoetischer Zelllinien und primärer Zellen*

Das hämatopoetische Mikromilieu ist stark kontrolliert, um die gezielte Steuerung einer Vielzahl paralleler Prozesse zu gewährleisten. Zu dieser Regulation gehört nicht nur die Zusammenstellung und die Konzentration verschiedener Wachstumsfaktoren oder die Präsenz von Faktoren der Extrazellulärmatrix. Die moderne Bioverfahrenstechnik eröffnet die Möglichkeit der Kontrolle einer Reihe zusätzlicher essenzieller Parameter der hämatopoetischen Zellkultur. Dazu zählen die lokale Gelöstsauerstoff-Konzentration, der pH-Wert, die Osmolarität und die kontinuierliche Zufuhr von Nährstoffen sowie Entfernung von Metaboliten. Wie bereits in Abschnitt 1.4.5.5 der Einleitung vorgestellt, existiert eine Reihe auf unterschiedlichen Prinzipien basierender Bioreaktorsysteme. Die vorliegende Arbeit wurde mit einem voll-kontrollierten, miniaturisierten, gerührten Suspensionskultursystem durchgeführt. Die Vorteile dieses Systems liegen in der Möglichkeit einer großen Zellausbeute innerhalb kurzer Zeit durch die dreidimensionale Kultur, damit verbunden ein einfaches Scale-up des Prozesses, kontrollierte physikochemische Kulturparameter sowie einer einfachen und schonenden Zellernte.

Zu Beginn der Arbeit stand die bioverfahrenstechnische Charakterisierung des neuartigen Bioreaktorsystems.

3.10.1 Verfahrenstechnische Charakterisierung des Bioreaktorsystems

3.10.1.1 Mischzeitcharakteristik des Bioreaktorsystems

Das Homogenisieren von mehreren miteinander mischbaren Flüssigkeiten zum Zweck des Konzentrations- und Temperatenausgleichs zählt neben dem Suspendieren und Dispergieren zu den Primäraufgaben von Bioreaktoren (Storhas, 1994; Mersmann et al., 1975).

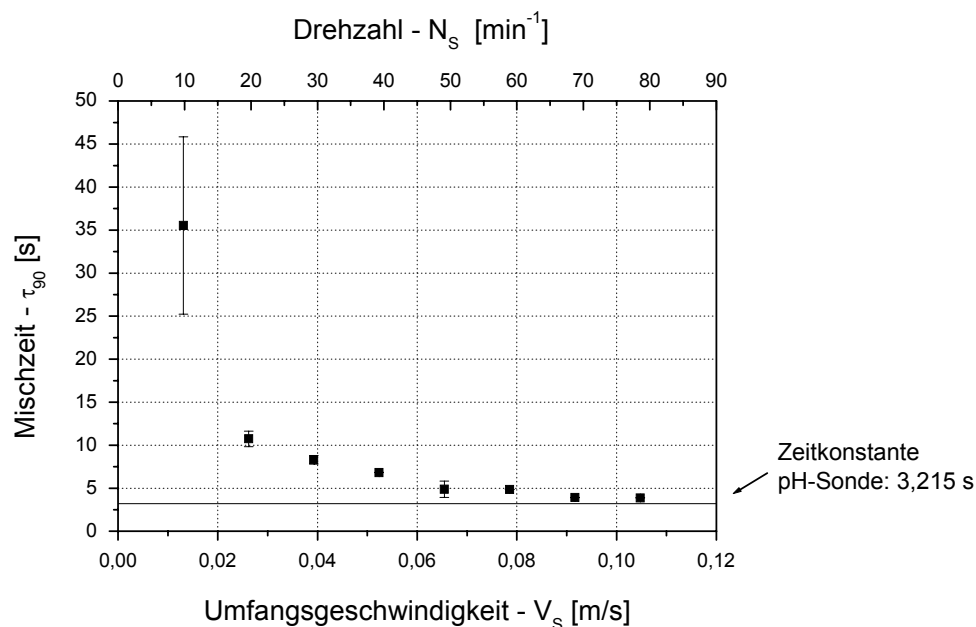


Abbildung 3.35: Einfluss der Rührerumfangsgeschwindigkeit auf die Mischzeit τ_{90} . Die dargestellten Mischzeiten sind repräsentativ für den Suspensionsbioreaktoraufbau im Perfusionsbetrieb. Die Kultivierung der Zelllinien und humanen hämatopoetischen Zellen erforderte Drehzahlen von 40 bis 60 min^{-1} . Die Begasungsrate betrug 0,5 vvm bei einem Kulturvolumen von 60 mL.

Die Mischzeit eines beliebigen Systems ist geeignet eine Aussage über die Qualität relativ zum idealen mischzeitfreien System zu treffen. Obwohl die Mischzeit, aufgrund der relativ langsamen Umsetzung von Substraten, in einem Zellkulturreaktor in der Regel keine große Rolle spielt, gibt sie Aufschluss darüber, wie nah das betrachtete System dem idealen, mischzeitfreien Zustand kommt. Die Mischzeiten (τ_{90}) wurden innerhalb eines Drehzahlbereichs von 10 bis 80 min^{-1} ermittelt nach der in Abschnitt 2.12.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Die

Ergebnisse der Mischzeitbestimmung sind in Abbildung 3.35 zusammengefasst. Zur Reduktion der Kulturmedienkosten und im Hinblick auf die geringe Verfügbarkeit der adulten Stammzellen wurde eine Minimierung des Arbeitsvolumens des Systems auf 40 bis 60 mL angestrebt. Die Analyse ergab eine Mischzeit von ca. 5 s im Bereich von 50 min^{-1} , bei einer Messsonden-Zeitkonstante von 3 s. Die Mischzeit im System ist damit bei einer Verdopplungszeit der Zellen von ca. 24 Stunden absolut vernachlässigbar und unkritisch im Hinblick auf die Zufütterung in der kontinuierlichen Betriebsweise. In Bioreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 20 bis 100 Liter können zum Vergleich Mischzeiten im Bereich von 5 bis 10 min ermittelt werden (Vorlop, 1990). Gilbertson und Mitarbeiter ermittelten Mischzeiten im Bereich von 10 bis 40 s für einen 250 mL (Arbeitsvolumen: 200 mL) und zwei 500mL (Arbeitsvolumen: 500 mL) Bioreaktoren mit zwei unterschiedlichen Rührerkonfigurationen (siehe auch Tabelle 1.5; Paddel- vs. 4-Blatt-Impeller-Rührer). Sie konnten zudem nachweisen, dass die Bestückung des Reaktors mit Sonden zu einer signifikanten Verlängerung der Mischzeit führt (Gilbertson et al., 2006).

3.10.1.2 Sauerstoff-Übergangskoeffizient k_La des Bioreaktorsystems

Eine weitere Primäraufgabe von Bioreaktoren ist die Versorgung der aeroben Prozesse mit Sauerstoff. Eine charakteristische Kenngröße für die Leistungsfähigkeit des Systems ist der experimentell zu ermittelnde volumetrische Sauerstoffübergangskoeffizient k_La . Die Haupteinflussgrößen bei der in diesem Fall ausschließlich blasenfreien Membranbegasung ohne Kopfraumbegasung sind der Eingangsmolenstrom, der Eingangsmolenbruch, der Transmembrandruck und der volumetrische Sauerstoff-Übergangskoeffizient k_La . Der k_La -Wert seinerseits ist abhängig von der Drehzahl und damit der Rührerumfangsgeschwindigkeit, der kinematischen Viskosität der Reaktorflüssigkeit und dem Diffusionskoeffizienten des Sauerstoffs in der Reaktorflüssigkeit. Die Ergebnisse der k_La -Wert-Bestimmung sind in Abbildung 3.36 aufgetragen. Zur Bestätigung der auf Basis der Tangenten-Methode berechneten k_La -Werte wurden diese zusätzlich mit der 63%-Methode berechnet und zum Vergleich ebenfalls dargestellt. In Tabelle 4.1 sind von anderen Autoren experimentell ermittelte k_La -Wert-Bereiche für verschiedene Begasungsstrategien aufgeführt.

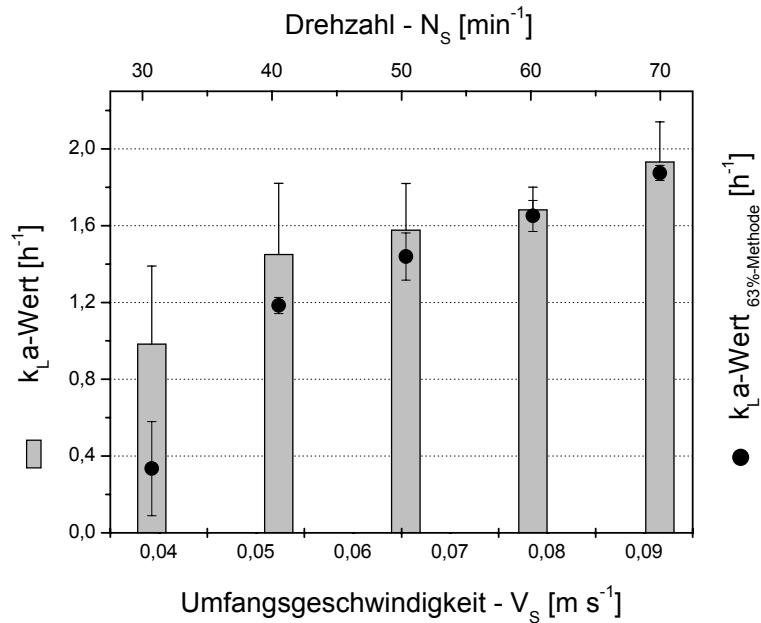


Abbildung 3.36: Einfluss der Rührerumfangsgeschwindigkeit auf den k_La -Wert (Tangenten-Methode). Alternative k_La -Werte wurden mit der 63%-Methode ermittelt. Dargestellte k_La -Werte sind charakteristisch für einen auf kontinuierliche Betriebsweise vorbereiteten Bioreaktor (s. Abschnitt 2.11). Die Begasungsrate betrug 0,5 vvm bei pO_2 -Werten von 30% Luftsättigung und einer kontrollierten Temperatur von 37° C.

Die Ergebnisse mit 0,4 bis 1,8 h $^{-1}$ in dem betrachteten Drehzahlbereich (siehe Abschnitt 3.12.1.2) liegen am unteren Ende des in der Literatur vorgezeichneten Bereichs für Membranbegasung von 0,9 bis 6 h $^{-1}$. Der ermittelte k_La -Wert als Funktion der Drehzahl bestimmt die entsprechend maximale Sauerstoffeintragsrate und begrenzt damit die maximal mit Sauerstoff zu versorgende Zellmenge.

Tabelle 4.1: k_La -Wert-Bereiche unterschiedlicher Begasungsstrategien (Vorlop, 1990)

Begasungsstrategie	k_La -Wert [h $^{-1}$]
Begasung über Flüssigkeitsoberfläche	0,1 - 0,7
Begasung mit Oberflächenbegaser	0,9 - 5,2
Membranbegasung	0,9 - 6,4
Spinfilter und Vibratoren	2,0 - 5,4
Blasenbegasung	1,0 - 20

Die maximal tolerierbare und damit physiologische Drehzahl wird wiederum durch das zelluläre System vorgegeben und hängt von dessen individueller Schersensitivität im gegebenen System ab. Die optimale Drehzahl führt Parameter wie Stofftransport, Suspendierung, Aufwirbelung, Schersensitivität auf einen Punkt.

Diese wurde zunächst exemplarisch anhand von Leukämiezelllinien ermittelt und sollte dann auf das Primärzellsystem übertragen werden (siehe Abschnitt 3.10.2.5).

3.10.2 Kultivierung im Bioreaktorsystem

3.10.2.1 Kultivierung der HL-60 Zelllinie

Einführende Kultivierungen im selbst entwickelten Dreifach-Minibioreaktorsystem wurden zunächst mit der humanen Leukämie-Zelllinie HL-60 durchgeführt. Primär sollte die Kompatibilität der verwendeten Bioreaktor-Materialien hinsichtlich Stahl-, Glas- und Kunststoffsorte zu humanen Zelllinien demonstriert werden. Dabei sollte zunächst gezeigt werden, dass die Kultur in allen drei Bioreaktoren weitgehend identisch durchgeführt und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse somit vorausgesetzt werden kann. Dazu wurden Parallelkulturen bei einer Drehzahl von 35 min^{-1} durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass im Mittelwert zwar eine Abweichung zur Spinnerkulturflasche von 20% möglich ist, die drei Bioreaktoren jedoch jederzeit vergleichbare Kulturergebnisse zeigen (siehe Abb. 3.37 A).

3.10.2.2 Ermittlung der optimalen Rührerdrehzahl

Auch zur Ermittlung der optimalen Drehzahl wurden Kultivierungen parallel in Spinnerflaschen der Fa. Techne durchgeführt (s. Abbildung 3.37 B). Diese wurden als Referenzkultur und damit als 100% Leistung definiert. Die Entwicklung der Zellkonzentrationen zeigte, dass Drehzahlen im Bioreaktor in einem Bereich zwischen 27 und 40 min^{-1} dem Ergebnis der Spinnerkultur am nächsten kommen ($-7,3 \pm 8,1\%$, negatives Vorzeichen: Vorteile für die Techne-Spinnerflasche). Der Drehzahlbereich von 60 bis 70 min^{-1} zeigte mit $-21 \pm 8\%$ ein signifikant schlechteres Ergebnis ($p=0,023$). Damit wurde die Drehzahl für die Bioreaktorkultivierungen, basierend auf den Ergebnissen HL-60-Kultivierungen zunächst auf 35 min^{-1} festgelegt. Die Zellen waren im gesamten untersuchten Drehzahlbereich vollständig suspendiert und zeigten eine höhere apparente Wachstumsrate bei geringerer Scherbelastung. Das Scherstress neben dem Einfluss auf die Proliferation auch Auswirkungen auf Oberflächenantigenexpression haben kann, zeigen die Ergebnisse

von McDowell und Papoutsakis (McDowell und Papoutsakis, 1998a). Sie untersuchten den Einfluss der Drehzahl in gerührter Kultur von HL-60-Zellen auf Wachstumsrate und CD13-Expression in einem Bereich von 80 bis 400 min^{-1} . Die Resultate deuteten auf eine mit zunehmender Drehzahl abnehmende apparente Wachstumsrate hin. Den gegensätzlichen Effekt zeigte die ansteigende Scherrate auf die CD13-Expression. In weiterführenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Einsatz hoher Serumkonzentrationen (10% FCS) geeignet ist, den zellschädigenden Effekt hoher Drehzahlen zu reduzieren (McDowell und Papoutsakis, 1998b).

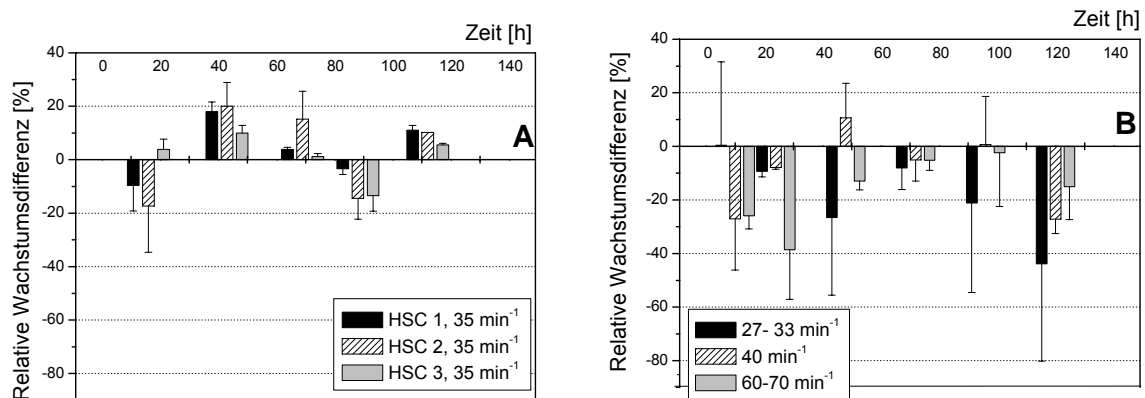


Abbildung 3.37: Relatives Wachstum von HL-60 Zellen in den Bioreaktoren 1 bis 3 bei einheitlicher Rührerdrehzahl von 35 min^{-1} (A, $n=3$) und unterschiedlicher Rührerdrehzahl (B, $n=3$). Zum Vergleich wurde die Lebendzellzahl einer Techne-Spinnerflasche mit einer Drehzahl von 50 min^{-1} zu jedem Zeitpunkt als 100% definiert. Die Begasungsrate der Bioreaktoren wurde auf 0,25 vvm eingestellt und der pO_2 -Wert bei 30% Luftsättigung geregelt. Das Inokulum betrug in allen Fällen $1 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$ Zellen mit einer Viabilität größer 95%. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit 10% FCS verwendet.

3.10.2.3 Experimentelle Überprüfung der theoretisch ermittelten OTR_{max}

Die Leistungsfähigkeit eines Bioreaktorsystems wird durch die individuellen, verfahrenstechnischen Grenzen bestimmt. Bestandteil dieser Analyse ist die Abschätzung der maximalen Sauerstoffeintragsrate (Maximum Oxygen Transfer Rate – OTR_{max}) bei vorgegebenen Kulturparametern. Dabei werden alle physikochemischen Kulturparameter von dem zu kultivierenden Zelltyp vorgegeben. Auf dieser Basis kann die maximal versorgbare Zellzahl von humanen primären Stamm- und Vorläuferzellen abgeschätzt werden. Da zur Ermittlung der OTR keine Abgasanalyse zur Bilanzierung der ein- und ausgetragenen Sauerstoffmenge im System zur Verfügung stand, wurde dieses modellhaft über die Perfusionskultur von

HL-60 Zellen an die verfahrenstechnische Grenze herangeführt. Dabei sollte die experimentelle Überprüfung der theoretisch ermittelten maximalen OTR durchgeführt werden. Über die Regelung des Gelöstsauerstoff-Partialdrucks steigt mit zunehmender Zellzahl der zur Aufrechterhaltung des pO_2 -Sollwertes geforderte Eingangsmolenbruch x_{OGE} an. Die verfahrenstechnische Grenze des Systems ist in dem Moment erreicht, wenn $x_{OGE} = x_{O_2} - x_{CO_2} = 0,945$ erreicht ist und der apparente pO_2 -Wert auf Null abgesunken ist. In diesem Moment setzt sich die Begasungsatmosphäre aus 94,5% reinem Sauerstoff und 5,5% Kohlendioxid für das Karbonat-Puffersystem zusammen. Zu diesem Zeitpunkt wird der über das Begasungssystem eingetragene Sauerstoff von den Zellen unmittelbar komplett verbraucht und die Sauerstoffaufnahme OUR (Oxygen Uptake Rate) ist gleich der OTR und in dem Fall der OTR_{max} . Über den experimentell ermittelten k_La -Wert lässt sich damit die spezifische Sauerstoffaufnahme der Zellen berechnen. Bei bekannter Sauerstoffaufnahme kann man den erreichten k_La -Wert kontrollieren und damit eine Plausibilitätsüberprüfung durchführen. Die theoretische maximale Sauerstoffeintragsrate berechnet sich bei einer Rührerdrehzahl von 50 min^{-1} und dem volumetrischen Sauerstoffübergangskoeffizienten k_La von $1,6 \text{ h}^{-1}$ (vergl. Abb. 3.36) und einer maximalen Sauerstofflöslichkeit in dem Kulturmedium von $c_{O_2,max}$ von $7,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (abgeschätzt nach Schumpe et al., 1982) sowie einer apparenten Gelöstsauerstoff-Konzentration von $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ zu einem Wert von $12,03 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{O}_2 (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$. Bei Annahme einer mittleren spezifischen Sauerstoffaufnahme für Leukozyten von $1 \cdot 10^{-12} \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ (siehe Tabelle 3.9) und ca. $2,5 \cdot 10^7$ Zellen mL^{-1} (s. Abbildung 3.38) und einem Kulturvolumen von 50 mL berechnet sich die volumetrische Sauerstoffaufnahme zu $25 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$.

Tabelle 3.9: Spezifische Sauerstoffaufnahme primärer hämatopoetischer Zellen in Zellkulturen

spezifische Sauerstoffaufnahme [$\text{g O}_2 \cdot (\text{Zelle} \cdot \text{h})^{-1}$]	Zelltyp	Quelle
$1,28 \cdot 10^{-12}$	humane Leukozyten	Vorlop, 1990
$0,70 \cdot 10^{-12}$	humane Granulozyten	Bird et al., 1951
$0,54 \cdot 10^{-12}$ bis $3,84 \cdot 10^{-12}$	humane CFU	Collins et al., 1997
$0,32 \cdot 10^{-12}$ bis $1,28 \cdot 10^{-12}$	rat BMMNC	Lutton et al., 1972
$0,81 \cdot 10^{-12}$ bis $1,22 \cdot 10^{-12}$	humane BMMNC	Peng und Palsson, 1996

Die verfahrenstechnische Grenze konnte somit bis auf eine Abweichung von ca. Faktor 2 (rechnerisch: $25 \cdot 10^{-3} \text{ g O}_2 \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1} / 12,03 \cdot 10^{-3} \text{ g O}_2 (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) mit der biologischen Grenze zur Deckung gebracht werden.

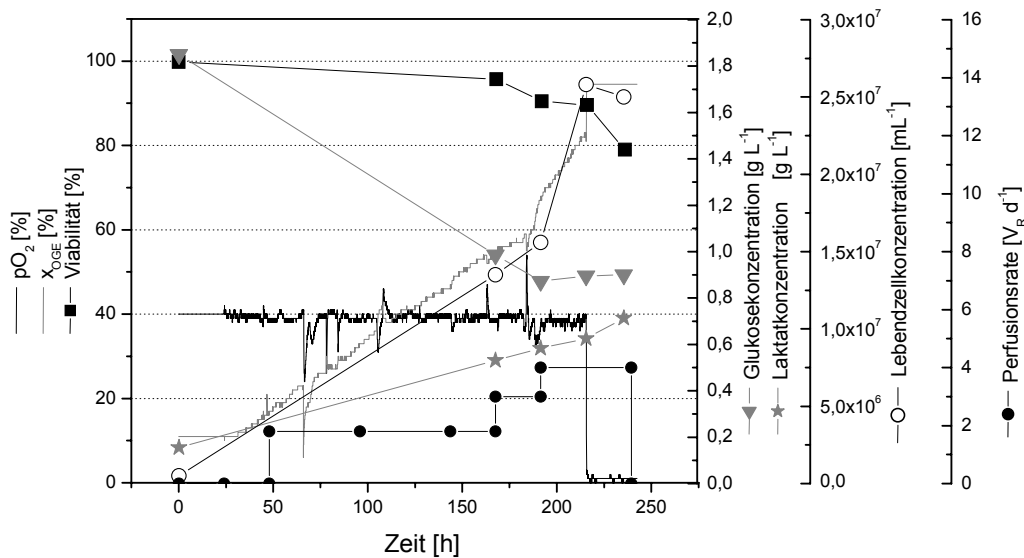


Abbildung 3.38: Repräsentativer Verlauf einer kontinuierlichen Kultivierung von HL-60 Zellen. Aufgetragen wurde der bis zur verfahrenstechnischen Grenze geregelte Gelöstsauerstoff-Partialdruck $p\text{O}_2$ (40% Luftsättigung), der vom $p\text{O}_2$ -Regler geforderte prozentuale O_2 -Molenbruch in der Begasungsatmosphäre (x_{OGE}), die Perfusionsrate in Reaktorvolumina (V_R) pro Tag, die Viabilität der Zellen, die Glukose- und Laktatkonzentration sowie die Lebendzellkonzentration.

Einen Erklärungsansatz für die Diskrepanz kann der zum Zeitpunkt ($p\text{O}_2=0$) nicht kontrollierte Druck liefern, der einen direkten Einfluss auf die maximale Sauerstofflöslichkeit hat. Eine weitere Erklärung liegt im Zeitpunkt der Probenahme und damit der bestimmten maximalen Zellzahl, die nicht genau auf den exakten Zeitpunkt des vollständigen Verbrauchs des gelösten Sauerstoffs ($p\text{O}_2=0$) abgestimmt werden konnte. Unter den gewählten Bedingungen ergibt sich mit der humanen Leukämiezelllinie HL-60 eine maximal kultivierbare Zellzahl von $2,5 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Eine Steigerung der maximalen Sauerstoffeintragsrate kann über eine kontrollierte Erhöhung des Druckes im Reaktor oder Vergrößerung der Kontaktfläche von Begasungsmembran und Flüssigkeitsvolumen erreicht werden. Eine Erhöhung des Sauerstoffeingangsmolenbruches in der Begasungsatmosphäre ist durch die Verwendung reinen Sauerstoffs begrenzt.

3.10.2.4 Korrektur der Rührerdrehzahl für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen

Primäres Ziel bei der submersen Kultivierung insbesondere von schersensitiven Primärzellen ist es, die vollständige Suspendierung der Zellen bei möglichst niedriger Drehzahl zu erreichen. Dabei wird die Drehzahl bei gegebener Reaktor- und Rührergeometrie, Viskosität und Dichte der flüssigen Phase von den äußeren Zellabmessungen und dem spezifischen Gewicht der zu suspendierenden Zellen bestimmt. Initiale Kultivierungen mit aufgereinigten humanen, hämatopoetischen Zellen im Bioreaktor scheiterten an der Suspendierung des Inokulums. Die gewählte Drehzahl von 35 min^{-1} , basierend auf den Erfahrungen mit der HL-60-Zelllinie, war nicht geeignet die größeren, primären Zellen an der Sedimentation zu hindern. Eine weitere Zelllinie, die als Modellzelllinie für die Bioreaktorkultivierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen eingesetzt wird, ist die KG-1a (Schmidt, 2000). Mit Hilfe des Zellgrößenanalysators wurde der mittlere Zelldurchmesser von HL-60 Zellen mit $6,5 \mu\text{m}$ (Bereich: 6 bis $12 \mu\text{m}$), KG-1a mit $10,5 \mu\text{m}$ (Bereich: 8 bis $18 \mu\text{m}$) und primärer Zellen mit $12 \mu\text{m}$ (Bereich: Inokulum, hoher Anteil CD34^+ -Zellen: 7 bis $10,5 \mu\text{m}$, nach 240 bis 312 h Kultur, niedriger Anteil CD34^+ -Zellen: 7 bis $13,5 \mu\text{m}$) bestimmt.

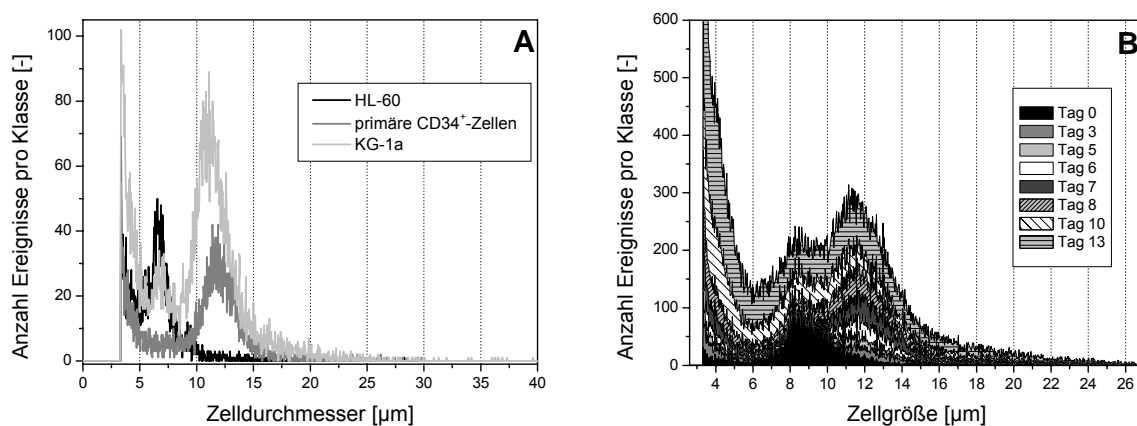


Abbildung 3.39: Zellgrößenverteilung nach 4-tägiger Kultur für die HL-60-, die KG-1a-Zelllinie und primäre CD34^+ -Zellen (A). Zeitliche Entwicklung der Zellgrößenverteilung einer 13-tägigen Kultivierung humaner CD34^+ -Zellen in einem Techne-Spinner mit einer Drehzahl von 50 min^{-1} (B). Die Analyse wurde mit einem CASY-1® Modell TTC (Schärfe System, Auflösung: 1024 Klassen, 150- μm -Messkapillare) durchgeführt.

Die Analyse der Zellgrößenverteilung (siehe Abb. 3.39) bestätigte die rechnerisch ermittelte Forderung nach einer höheren Rührerdrehzahl. Bei sonst identischen

Bedingungen, wie z. B. Anstellwinkel der Rührerblätter, weiterer geometrischer Abmessungen im Reaktor und Eigenschaften des Kulturmediums wurde eine minimale Rührerdrehzahl von ca. 50 min^{-1} berechnet. Die Optimierung der Rührerdrehzahl für die Kultur der Primärzellen sollte nach den Erkenntnissen der Zellgrößenverteilung anhand dieser Modellzelllinie durchgeführt werden. Auch Collins und Mitarbeiter haben den essenziellen Einfluss der Rührergeschwindigkeit und des Reaktordesigns, speziell des Rührerdesigns, für die submerse Kultur von CD34^+ -selektierten peripheren Blutstammzellen aber auch Nabelschnurblut nachgewiesen (Collins et al., 1998a). Durch die Optimierung des Verhältnisses von Rührerdurchmesser zum Durchmesser des Reaktorgefäßes in Bellco-Spinnerflaschen (Modell 1967 mit Flat-Blade Rührer Modell 1965) konnten sie für die Expansion von CFU-GM und CFU/BFU-E und die Gesamtzellzahl einen Vorteil für die Spinnerkultur relativ zur Kulturflasche zeigen. Schroeder und Mitarbeiter nutzen sogar die entstehenden Scherkräfte, um in einer gerührten Bioreaktorkultur von murinen embryonale Stammzellen die Formierung von „Embryoid Bodies“ und die Expansion und Differenzierung von embryonalen Stammzellen in funktionelle Kardiomyozyten über die Rührerdrehzahl zu kontrollieren (Schroeder et al., 2005)

3.10.2.5 Kultivierung der KG-1a und Ermittlung der optimalen Drehzahl

Zur Ermittlung der optimalen Drehzahl für die KG-1a-Zelllinie wurden analog zur HL-60 Kultivierungen parallel zu Spinnerflaschenkulturen durchgeführt. Rechnerisch wurde auf der Basis der Gleichung 19 (Abschnitt 2.14.3) eine Erhöhung der erforderlichen Drehzahl um 30% ermittelt (HL-60: 35 min^{-1}). Die Drehzahl wurde daher in Anbetracht der mit ihr steigenden Scherkräfte in einem Bereich zwischen 40 und 60 min^{-1} untersucht (Abb. 3.40 A). Die Untersuchung des Einflusses der Drehzahl offenbarte zu den betrachteten Zeitpunkten eine gute Vergleichbarkeit der Zellkonzentration mit der Spinnerkulturflasche bei 60 min^{-1} ($+3,3 \pm 2,4\%$). Bei einer Drehzahl von 50 min^{-1} zeigte der Bioreaktor mit $-9,8 \pm 6,8\%$ ein Ergebnis leicht unter der Spinnerkulturflasche ($p=0,04$). Die einer nochmals verringerten Drehzahl von 40 min^{-1} weist der Bioreaktor mit $-52 \pm 7\%$ eine deutlich schlechtere Leistung auf ($p<0,001$). Eigene Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Sedimentation von Zellen für das schlechte Kulturergebnis verantwortlich war. Die Drehzahl wurde

daher in Erwartung einer relativ zu 60 min^{-1} geringeren Scherbelastung auf 50 min^{-1} festgelegt.

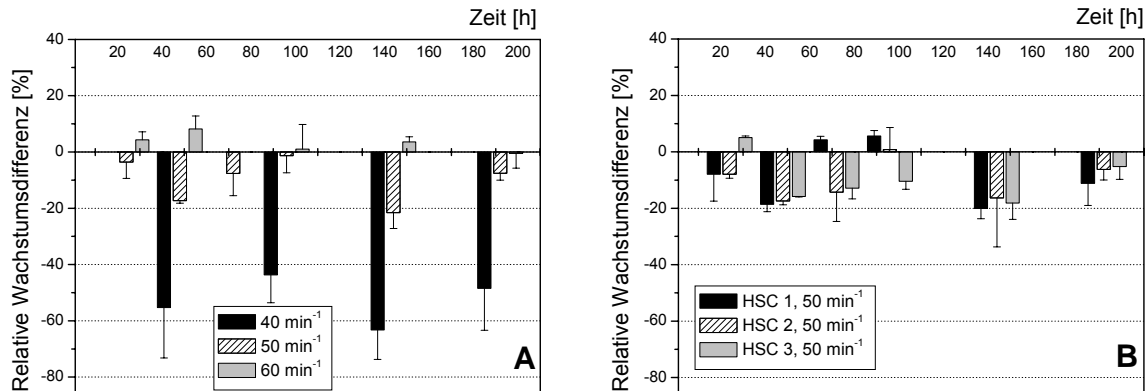


Abbildung 3.40: Relatives Wachstum von KG-1a Zellen in den Bioreaktoren 1 bis 3 bei unterschiedlicher Rührerdrehzahl (A) und einheitlicher Rührerdrehzahl von 50 min^{-1} (B). Zum Vergleich wurde die Zelldichte einer Techne-Spinnerflasche mit 50 min^{-1} zu jedem Zeitpunkt als 100% definiert. Die Begasungsrate der Bioreaktoren wurde auf 0,25 vvm eingestellt und der pO_2 -Wert auf 30% Luftsättigung geregelt. Das Inokulum betrug in allen Fällen $1 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$ Zellen. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit 10% FCS verwendet.

Im Anschluss wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in den drei Bioreaktoren demonstriert (Abb. 3.40 B). Die mittleren Abweichungen der Wachstumsergebnisse von KG-1a-Zellen zwischen den drei Reaktoren lagen bei maximal 20% und die Kulturen können als vergleichbar angesehen werden (Abb. 3.40 B).

3.10.2.6 Stoffwechselaktivität im Bioreaktorsystem

Zum Vergleich der Stoffwechselaktivität von HL-60, KG-1a sowie primären humanen Stamm- und Vorläuferzellen wurden die spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten in den verschiedenen Kulturgefäßen miteinander verglichen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden dabei die experimentell in der Spinnerkulturflasche ermittelten spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten als 100% definiert. Die spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten für die HL-60-Zelllinie im Bioreaktor liegen im Mittelwert bei $39 \pm 16\%$ bzw. $54 \pm 19\%$ über denen in Spinnerkulturen. Der gleiche Trend zeigt sich auch bei der Kultivierung der KG-1a Zelllinie, bei der die Raten $52 \pm 39\%$ bzw. $91 \pm 21\%$ über denen der Spinnerkulturen liegen. Auch die spezifischen

Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate der primären Zellkulturen weisen mit $+15 \pm 34\%$ bzw. $+12 \pm 36\%$ auf eine erhöhte spezifische Stoffwechselaktivität hin. Diese Beobachtungen passen zu den Ergebnissen von McDowell und Papoutsakis (1998). Sie konnten eine Drehzahlerhöhung und damit eine Erhöhung der Scherbelastung der Zellen mit 40 bis 90% höheren spezifischen Glukoseaufnahme- und Laktatbildungsrate korrelieren.

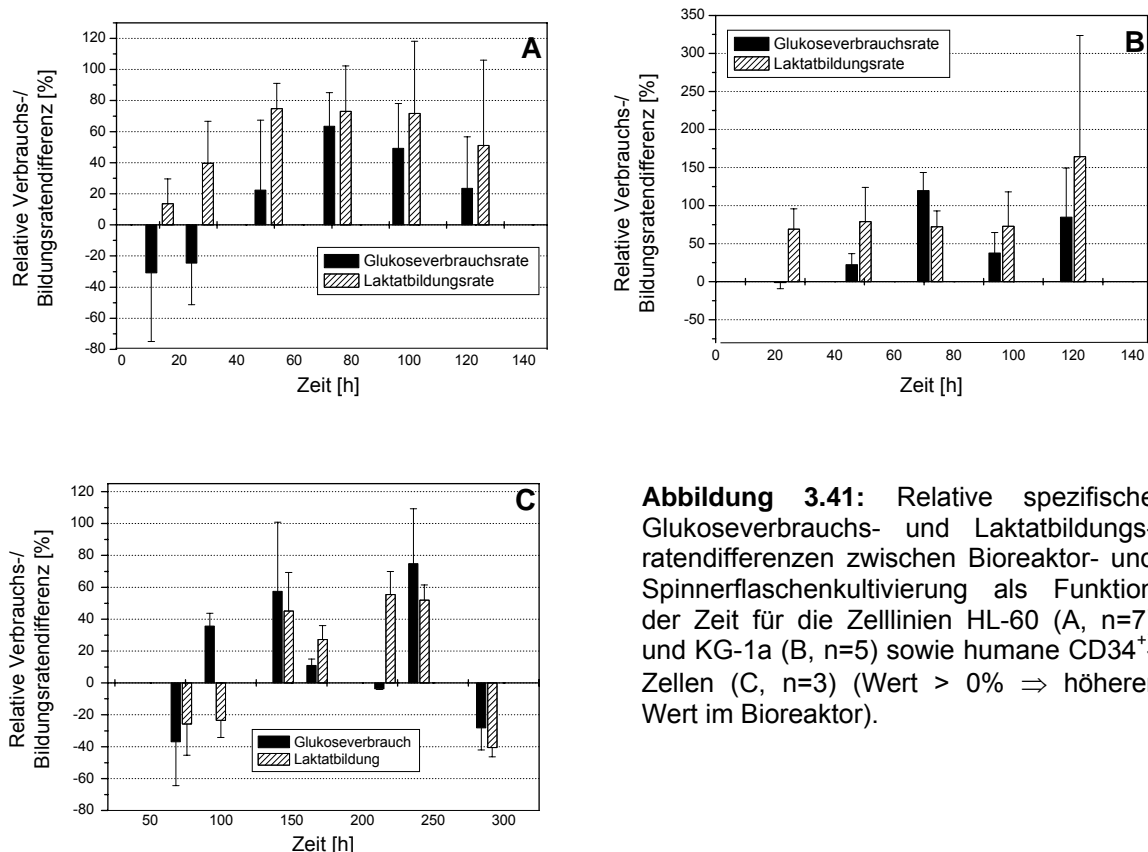


Abbildung 3.41: Relative spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate zwischen Bioreaktor- und Spinnerflaschenkultivierung als Funktion der Zeit für die Zelllinien HL-60 (A, n=7) und KG-1a (B, n=5) sowie humane CD34⁺-Zellen (C, n=3) (Wert > 0% \Rightarrow höherer Wert im Bioreaktor).

Bereits Al-Rubeai und Mitarbeiter beschrieben 1990 eine signifikant höhere metabolische Aktivität in Kulturen von Hybridomazellen mit Blasenbegasung im Vergleich zu Kulturen mit Kopfraumbegasung (Al-Rubeai et al., 1990). Eine vollständige Erklärung für die erhöhten Stoffwechselraten kann jedoch nicht allein die durch Al-Rubeai nachgewiesene verstärkte DNA-Synthese liefern. Eine umfangreiche Übersicht zu Scherstress-Effekten bei Pflanzen-, Insekten- und Säugetierzellkulturen wurde von Hua und Mitarbeitern erstellt (Hua et al., 1993). Sie berichteten ebenfalls von einem stimulierten, zellulären Metabolismus bei subletaler Einwirkung von Scherkräften. Für alle drei eingesetzten zellulären Systeme: HL-60,

KG-1a und humane Stamm- und Vorläuferzellen konnte, wie bereits beschrieben, eine erhöhte spezifische Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden, die ggf. auf eine höhere Scherbelastung der Zellen im Bioreaktorsystem relativ zur Techno-Spinnerkulturflasche hinwies. Es mussten daher Maßnahmen ergriffen werden, die die Scherbelastung bei gleich bleibender Suspendierung reduzieren. Zur Prüfung dieser Hypothese sollte der Einsatz von Pluronic F-68 als scherprotektivem Agens untersucht werden (Abschnitt 3.10.3).

3.10.2.7 Einfluss der Kulturdauer auf die Stoffwechselaktivität im Bioreaktor

Zur Analyse der Stoffwechselaktivität von primären humanen Stamm- und Vorläuferzellen in gerührten Bioreaktoren wurden die spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten in vier verschiedenen Kulturphasen eingeteilt: der frühen Kulturphase 0 bis 98 h, der 1. mittleren 120 bis 144 h, der 2. mittleren 168 bis 192 h und der späten Kulturphase 216 bis 312 h eingeteilt. Diese wurden mit Raten der HL-60 und KG-1a verglichen.

Tabelle 3.10: Spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten von humanen Leukämiezelllinien (HL-60, KG-1a) und primären, humanen, hämatopoetischen Zellkulturen, letztere als Funktion der Kulturzeit. Die Mittelwerte wurden aus Ergebnissen dynamischer Kulturen, Spinnerflaschen- und Bioreaktorkultivierungen berechnet.

Zellen	spez. Glukoseverbrauchsrate [$\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$]	spez. Laktatbildungsrate [$\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$]
HL-60 (n=7)	37 \pm 13	74 \pm 30
KG-1a (n=5)	21 \pm 10	30 \pm 11
humane CD34 ⁺ -Zellen (n=3)		
0 bis 98 h	50 \pm 18	61 \pm 30
120 bis 144 h	24 \pm 9	59 \pm 26
168 bis 192 h	23 \pm 4	43 \pm 13
216 bis 312 h	19 \pm 3	39 \pm 10

Die Daten in Tabelle 3.10 zeigen, dass die spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten von primären CD34-angereicherten Zellpopulationen in Kultur mit zunehmender Kulturdauer und zunehmendem Differenzierungsstatus abnehmen. Während die Stoffwechselaktivität an frühen Kulturtagen eher mit der HL-60 Zelllinie

zu vergleichen war, sank diese zum Ende der Kultur (216 bis 312 h Kultur) auf das durchschnittliche Niveau der KG-1a ab. Eine ähnliche Beobachtung konnten auch Collins und Mitarbeiter machen (Collins et al., 1997). Sie konnten zeigen, dass hohe spezifische metabolische Raten mit hohen relativen Anteilen an CD34-positiven CFU korreliert werden können. Auf der Basis dieser Korrelation entwickelten sie daraufhin eine semiquantitative Methode, um den Anteil der Vorläuferzellen in einer Kultur über die apparente spezifische Laktatbildungsrate abzuschätzen.

3.10.3 Reduzierung der Scherbelastung durch Pluronic F-68

Voruntersuchungen mit der KG-1a-Zelllinie und Suspendierungsversuche mit primären Zellen haben gezeigt, dass eine Erhöhung der Drehzahl auf 50 min^{-1} mit abwärtsgerichteter Strömung zu einer Verbesserung der Suspendierung führt. Weiterhin konnte in Bioreaktorkultivierungen eine erhöhte Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden (Abschnitt 3.10.2.6). Um die aus der Drehzahlerhöhung folgenden höheren Scherbelastungen zu kompensieren, sollte Pluronic F-68 eingesetzt werden. Pluronic F-68 ist ein nicht-ionisches, nicht-cytotoxisches Detergenz und besteht aus Kopolymeren aus Ethylen- und Propylenoxid. Pluronic F-68 (Pluronic) hat ein Molekulargewicht von 8.400 und besteht zu ca. 80% aus Ethylenoxid. Es wird besonders für Säuger- und Insektenzellen bei Kultivierungen im großen Maßstab angewendet. Es verhindert die Anheftung von Luftblasen an die Zellen, die bei der Durchmischung von Bioreaktoren entstehen und erhöht die Resistenz der Zellmembran gegen hydrodynamische Scherkräfte (Ghebeh et al., 1998; Palomares et al., 2000). Vorversuche mit primären hämatopoetischen Zellen und einer Pluronic-F-68-Konzentration von 0,5% zeigten weder negative Auswirkungen auf die Gesamtzellexpansion oder metabolische Parameter noch eine Toxizität gegenüber frühen und reifen Vorläuferzellen. Ziel der folgenden Untersuchung war der Vergleich der Bioreaktoren mit Techne-Spinnerkulturflaschen mit und ohne Zusatz von Pluronic. Dazu wurden zweimal zwei Kulturen in Mini-Bioreaktoren und 125-mL-Techne-Spinnerflaschen mit einem Kulturvolumen von 60 mL durchgeführt und mit einer Startzellkonzentration von $1 \cdot 10^5 \text{ CD34}^+ \text{ mL}^{-1}$ inokuliert. Der Anteil der CD34^+ -Zellpopulation im Inokulum betrug mehr als 95%. Das gemeinsame Inokulum aller 4 Ansätze wurde 72 h lang im Grundmedium

vorkultiviert. Für die Zellanalytik wurden danach täglich über einen Zeitraum von 288 h repräsentative Proben entnommen.

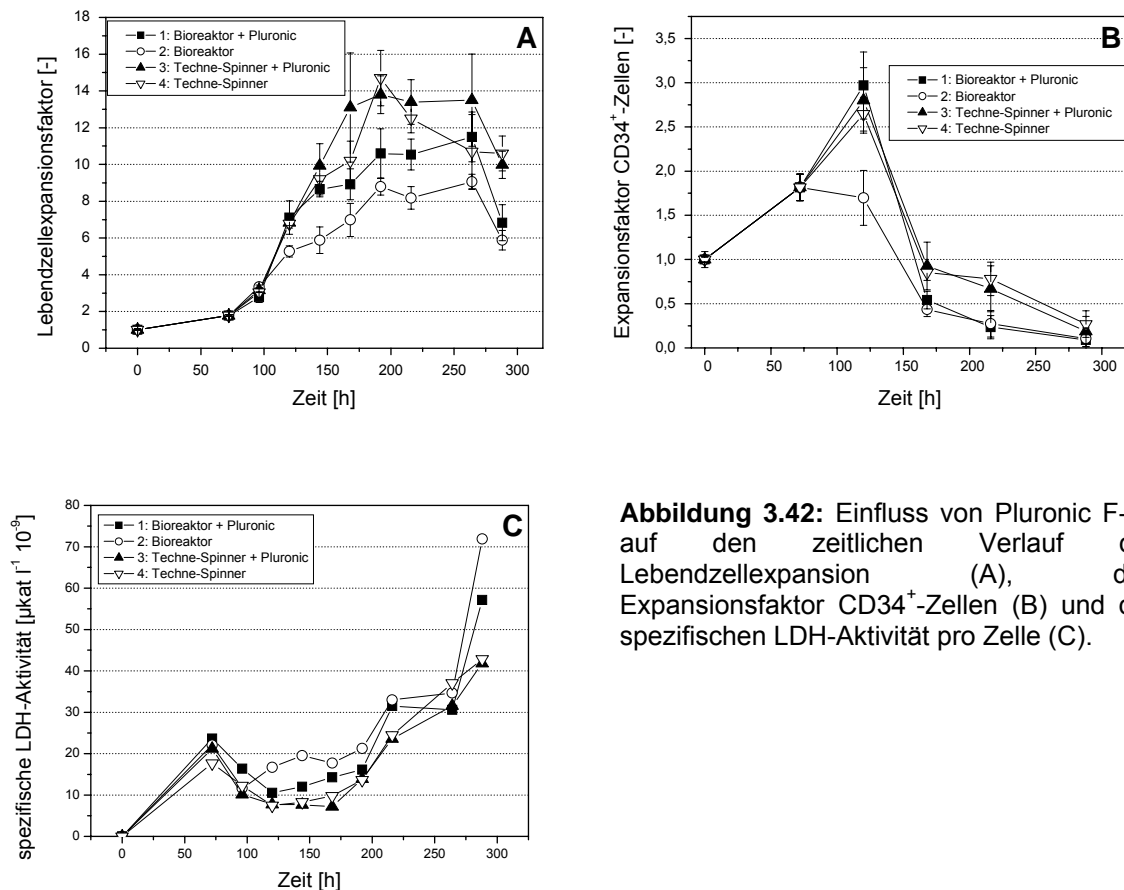


Abbildung 3.42: Einfluss von Pluronic F-68 auf den zeitlichen Verlauf der Lebendzellexpansion (A), den Expansionsfaktor CD34⁺-Zellen (B) und der spezifischen LDH-Aktivität pro Zelle (C).

Dem Grundmedium StemSpan SFM wurden 2% humanes AB-Serum, 50 U·mL⁻¹ Penicillin, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Streptomycin und 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hydrocortison sowie folgende Wachstumsfaktoren zugesetzt: 50 ng·mL⁻¹ SCF, 25 ng·mL⁻¹ IL-3 und 50 ng·mL⁻¹ Flt-3 Ligand. Den Ansätzen 1 und 3 wurde nach 72 h bei Überführung in die gerührten Kulturen 0,5% Pluronic F-68 zugesetzt. Sowohl die Spinnerflaschen als auch die Bioreaktoren wurden mit einer Drehzahl von 60 min⁻¹ durchmischt. In den Bioreaktoren wurde bei gegebener Drehrichtung des Rührers über die Neigung der Rührerblätter (45°) eine abwärtsgerichtete Strömung erzeugt. Die Begasungsatmosphäre enthielt in allen Kulturgefäßen 5,5% CO₂. Die Bioreaktoren wurden mit einer Begasungsrate von 30 mL·min⁻¹, entsprechend 0,5 vvm, begast. Der pO₂ wurde in den Bioreaktoren auf 20% Luftsättigung geregelt.

Der zeitliche Verlauf der Expansion der gesamten Zellpopulation ist in Abbildung 3.42 A gezeigt. Die Spinnerkulturen (Ansatz 3 und 4) zeigten nach 192 h die höchsten Expansionsfaktoren mit ca. 14. Beide liegen zwischen 168 und 216 h Kultur deutlich und teilweise signifikant über dem Bioreaktoransatz 2 (168 h: $p_{2-4}=0,039$, $p_{2-3}=0,085$; 192 h: $p_{2-3}=0,005$, $p_{2-4}=0,01$, 216 h: $p=n.s.$). Die Unterschiede zwischen den Spinnerkulturen und Ansatz 1 mit Pluronic sind zwar erkennbar, erreichen aber keine statistische Signifikanz. Ebenso verlaufen die Ansätze 3 und 4 vergleichbar und zeigen untereinander keine statistisch signifikante Abweichung. Der Verlauf der CD34⁺-Zellexpansion ergab ein nur teilweise vergleichbares Ergebnis. Während die Ansätze 1, 3 und 4 an nach 120 h ihren maximalen Wert von ca. 2,8-fach erreichen, unterstützt der Ansatz 2 ohne Pluronic nur eine 1,7-fache Expansion dieser Zellen und lag damit signifikant unter den anderen (p_{1-2} und $p_{2-4}<0,036$; $p_{2-3}=0,054$). Danach kam es in allen Ansätzen zu einem kontinuierlichen Verlust CD34-positiver Zellen. Die Spinnerkulturen lagen zwar nach 192, 216 und 264 h erkennbar über den beiden Bioreaktorkulturen, die Ergebnisse erreichten aber keine statistische Signifikanz. In Abbildung 3.42 C ist die auf die Gesamtzellzahl bezogene Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH-Aktivität) im Kulturüberstand gegen die Zeit aufgetragen, da sie eine bessere Vergleichbarkeit bei unterschiedlich stark wachsenden Kulturen ermöglicht. Die spezifische LDH-Aktivität ist ein Maß für die kulturbedingte Lyse der Zellen über die Freisetzung des Enzyms LDH in den Überstand. Obwohl diese Bestimmung nur einmal durchgeführt werden konnte, zeigte sie tendenziell, dass die Spinnerkulturen bei prinzipiell vergleichbarer Entwicklung der Freisetzung des Enzyms eine geringere Zelllyse erzeugten und die Ergebnisse zu jedem Zeitpunkt unter den Bioreaktorkultivierungen lagen. Der Ansatz 1 liegt ebenfalls nach 120 bis 168 h deutlich unterhalb des Ansatzes 2 ohne Pluronic, was auf eine Reduktion der Scherbelastung der Zellen durch den Zusatz von Pluronic hinweist. Die Entwicklung der erythrozytären Vorläuferzellen zeigte für alle Ansätze eine kontinuierliche Zunahme dieser Klasse von Zellen und an nach 168 h die maximale Expansion. Danach verringerte sich der Gehalt an BFU- und CFU-E in allen Ansätzen, wies jedoch nach 264 h Kultur für Ansatz 1 und 4 immer noch eine Expansion von 16- bzw. 10-fach über dem Inokulum auf. Die Entwicklung der granulozytär-monozytären Vorläuferzellen verlief anders. Hier konnte bis 264 h Kultur eine kontinuierliche Zunahme der Zellen in allen Ansätzen nachgewiesen werden. Dabei wurden zwischen 216 und 264 h Kultur in den Spinnerkulturen höhere Expansionsfaktoren

erreicht. Die Analyse der CAFC als Funktion der Zeit offenbarte einen Vorteil für die Kulturen mit Pluronic-Zusatz. Nach 216 h Kultur konnte deren Gehalt im Inokulum lediglich in den mit 0,5% Pluronic F-68 supplementierten Ansätzen 1 und 3 mit $1,18 \pm 0,2$ ($p_{1-2}=0,057$) bzw. $1,25 \pm 0,1$ erhalten werden. In den Ansätzen 2 und 4 sank der CAFC-Gehalt auf $0,73 \pm 0,1$ ($p_{2-3}=0,014$) bzw. $0,87 \pm 0,1$ ($p_{3-4}=0,04$) und lag damit deutlich unter dem von Ansatz 1 und signifikant unter dem Gehalt von Ansatz 3.

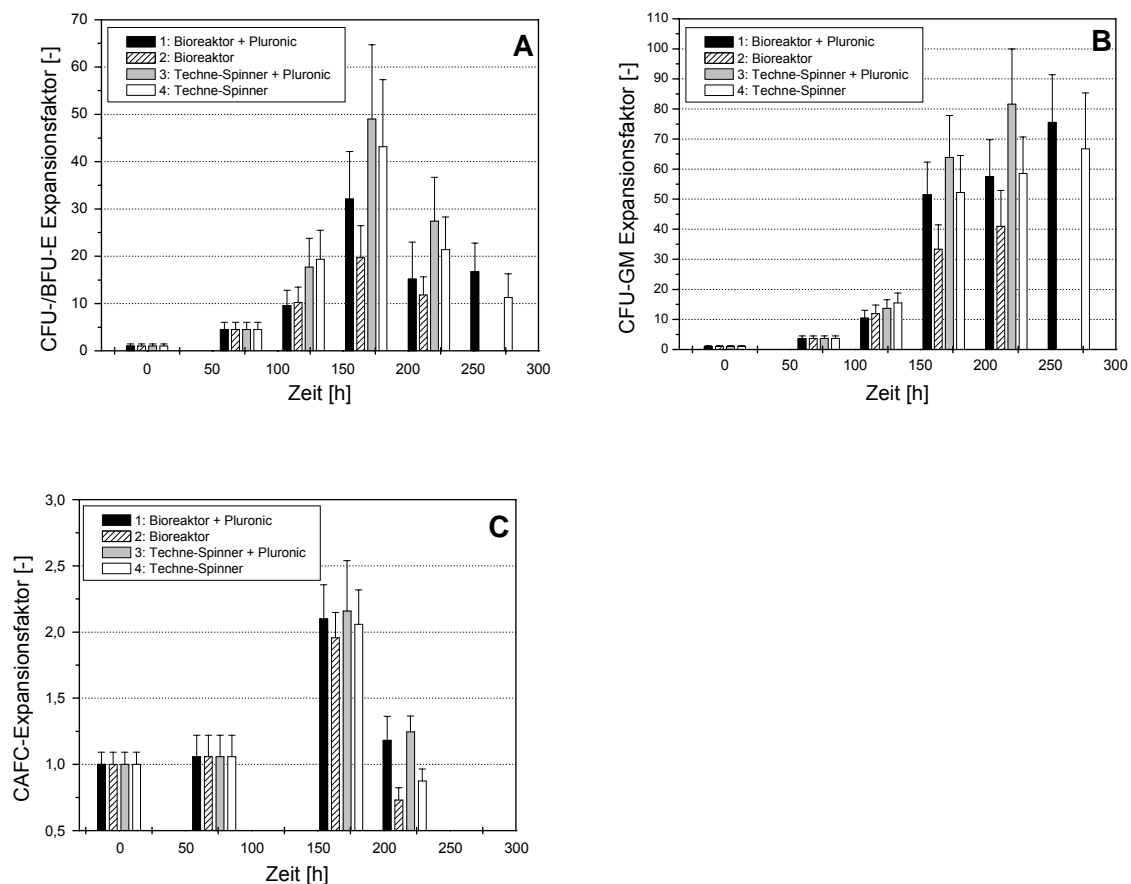


Abbildung 3.43: Einfluss von Pluronic F-68 auf den zeitlichen Verlauf der Expansion erythrozytärer Vorläuferzellen (A), granulozytär-monozytärer Vorläuferzellen (B) und der CAFC (C). Die BFU/CFU-E- und CFU-GM-Zahlen wurden nach 264 h Kultur für die Ansätze 2 und 3 nicht bestimmt.

Der Einsatz von Pluronic F-68 war geeignet, die Ausbeute an Gesamtzellen, CFU-/BFU-E und CFU-GM teilweise deutlich und die Ausbeute von CAFC signifikant zu erhöhen. Damit war die Vermutung bestätigt, dass die Nachteile des Bioreaktorsystems auf die erhöhte Scherbelastung zurückzuführen waren. Weiterhin konnte eindeutig gezeigt werden, dass Pluronic F-68 in Zellkulturen früher und reifer Stamm- und Vorläuferzellen keine toxische Wirkung hat und die Zellen in ihrem Wachstum nicht beeinträchtigt. Der Einsatz in Expansionskulturen mit Hinblick auf

den klinischen Einsatz ist z. Z. jedoch unmöglich, da keine arzneimittelrechtliche Zulassung der Substanz zum Einsatz am Menschen vorliegt. Möglichkeiten zum Einsatz dieser Substanz würde der Nachweis der Unbedenklichkeit zur Anwendung am Menschen im Rahmen klinischer Studien oder der Nachweis einer vollständigen Abtrennung der Substanz von den Zellen vor dem Einsatz am Menschen bieten. Zhang und Mitarbeiter analysierten ebenfalls die scherprotektive Wirkung von Pluronic F-68 auf hämatopoetische Zellen. Sie untersuchten in einem modifizierten Airlift-Bioreaktor die Überlebensraten von Erythrozytensuspensionen unter Zusatz von Pluronic F-68, humanem Serumalbumin und Dextran (durchschnittliches Molekulargewicht: 74,6 kDa). Während für Dextran und Albumin ein scherprotektiver Effekt gezeigt werden konnte, verfehlte Pluronic F-68 diese Wirkung auf Erythrozyten (Zhang et al., 1995). Dextran und Hydroxyethylstärke (HES), beide in der Arzneimittelherstellung von Plasmaexpandern (z. B. Longasteril bzw. Plasmasteril Infusionslösung, Fresenius Kabi) verwendet, entfalten ihre scherprotektive Wirkung über die Anhebung der Viskosität und damit Dämpfung turbulenter Strömungen. Humanes Serumalbumin konnte den gleichen Effekt hervorrufen und ist als 20%ige Lösung zur intravenösen Anwendung am Menschen zugelassen und kann daher als Alternative zu Pluronic F-68 empfohlen werden.

3.10.4 Perfusionskultur von humanen Zellen im Bioreaktor

Für die erfolgreiche Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen scheint die kontinuierliche Perfusion unter kontrollierten Kulturparametern eine notwendige Bedingung zu sein (Palsson et al., 1993). Die kontinuierliche Zufuhr von Nährstoffen und die simultane Entfernung von Medium, um die Akkumulation von toxischen metabolischen Produkten zu verhindern, wurden bereits untersucht (Gloeckner und Lemke, 2001; Koller et al., 1998a).

Um den positiven Effekt der Medienperfusion auf die Expansion einzelner Subpopulationen zu untersuchen, wurde ein Vergleich zwischen kontinuierlicher Perfusionskultur im Bioreaktor (Ansatz 2), dem satzweisen Batchbetrieb des Bioreaktors (Ansatz 1) und der Techne-Spinnerkulturflasche (Ansatz 3) durchgeführt. Dazu wurden die Kulturen in zwei Mini-Bioreaktoren und einer 125-mL-Techne-Spinnerflasche mit einem Kulturvolumen von 60 mL durchgeführt und mit einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5 \text{ CD34}^+ \text{ mL}^{-1}$ inokuliert. Der Anteil der CD34^+ -

Zellpopulation im Inokulum betrug mehr als 95%. Das gemeinsame Inokulum aller 3 Ansätze wurde 72 h lang in Grundmedium vorkultiviert. Für die Zellanalytik wurden im Zeitraum 72 bis 264 h Kultur und zum Zeitpunkt 312 h repräsentative Proben genommen. Dem Grundmedium StemSpan SFM wurden 2% humanes AB-Serum, 50 U·mL⁻¹ Penicillin, 50 µg·mL⁻¹ Streptomycin, 1 µmol·L⁻¹ Hydrocortison sowie folgende Wachstumsfaktoren zugesetzt: 50 ng·mL⁻¹ SCF, 25 ng·mL⁻¹ IL-3 und 50 ng·mL⁻¹ Flt-3 Ligand. Allen Ansätzen wurden 0,5% Pluronic F-68 zugegeben.

Sowohl die Spinnerflasche als auch die Bioreaktoren wurden mit einer Drehzahl von 50 min⁻¹ durchmischt. In den Bioreaktoren wurde bei gegebener Drehrichtung des Rührers über die Neigung der Rührerblätter (45°) eine abwärtsgerichtete Strömung erzeugt. Die Begasungsatmosphäre enthielt in allen Kulturgefäßen 5,5% CO₂. Die Bioreaktoren wurden mit einer Begasungsrate von 30 mL·min⁻¹, entsprechend 0,5 vvm, begast. Der pO₂-Wert wurde in den Bioreaktoren auf 20% Luftsättigung geregelt. Der kontinuierlich betriebene Bioreaktor 3 wurde im Bereich zwischen 144 und 216 Stunden mit einer Rate von 60 mL pro Tag mit Kompletmedium perfundiert. Im Folgenden sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente dargestellt. Die Mittelwerte der Ergebnisse wurden aus den zwei Experimenten berechnet, in denen an jedem Versuchstag aus dem entsprechenden Kulturgefäß zwei Proben entnommen wurden.

Der zeitliche Verlauf der Gesamtzellentwicklung ist in Abbildung 3.44 A gezeigt. Alle Kulturen zeigten einen kontinuierlichen Anstieg der Gesamtzellexpansion bis zu 144 h Kultur. Nach der Aktivierung der auf 72 h begrenzten Medienperfusion in der Kultur Bioreaktor 2 stieg die Gesamtzellzahl dieser zusammen mit der Techne-Spinner-Kultur parallel weiter an. Die Kultur in der Techne-Spinnerflasche erreichte das Maximum nach 192 h mit 39±4-fach. Der Ansatz Bioreaktor 2 erreichte erst nach 264 h mit 50±1-fach den höchsten Wert und lag damit erkennbar darüber. Die satzweise Kultur im Bioreaktor zeigte eine stationäre Phase im Bereich 14- bis 17-facher Gesamtzellexpansion und blieb damit deutlich unterhalb der anderen beiden Kulturansätze. Der Verlauf der CD34⁺-Zellexpansion offenbarte in allen Ansätzen einen kontinuierlichen Verlust dieser Zellen ab dem Zeitpunkt der Inokulation aus der Vorkultur. Während die CD34-Zellzahl in den Bioreaktoransätzen 1 und 2 bis nach 264 h Kultur auf ein Niveau von 60 bis 90% des Ausgangswertes sinken, ist die Spinnerkultur geeignet eine 50%ige Expansion dieser Zellen über den betrachteten Zeitraum aufrechtzuerhalten. Die Vorteile der Techne-Spinner relativ zu den

Bioreaktoren im Hinblick auf die Subpopulation CD34-positiver Zellen deutete sich bereits auch in den Experimenten zur Klärung des Einflusses von Pluronic, die im vorherigen Abschnitt 3.10.3 dargestellt sind, an.

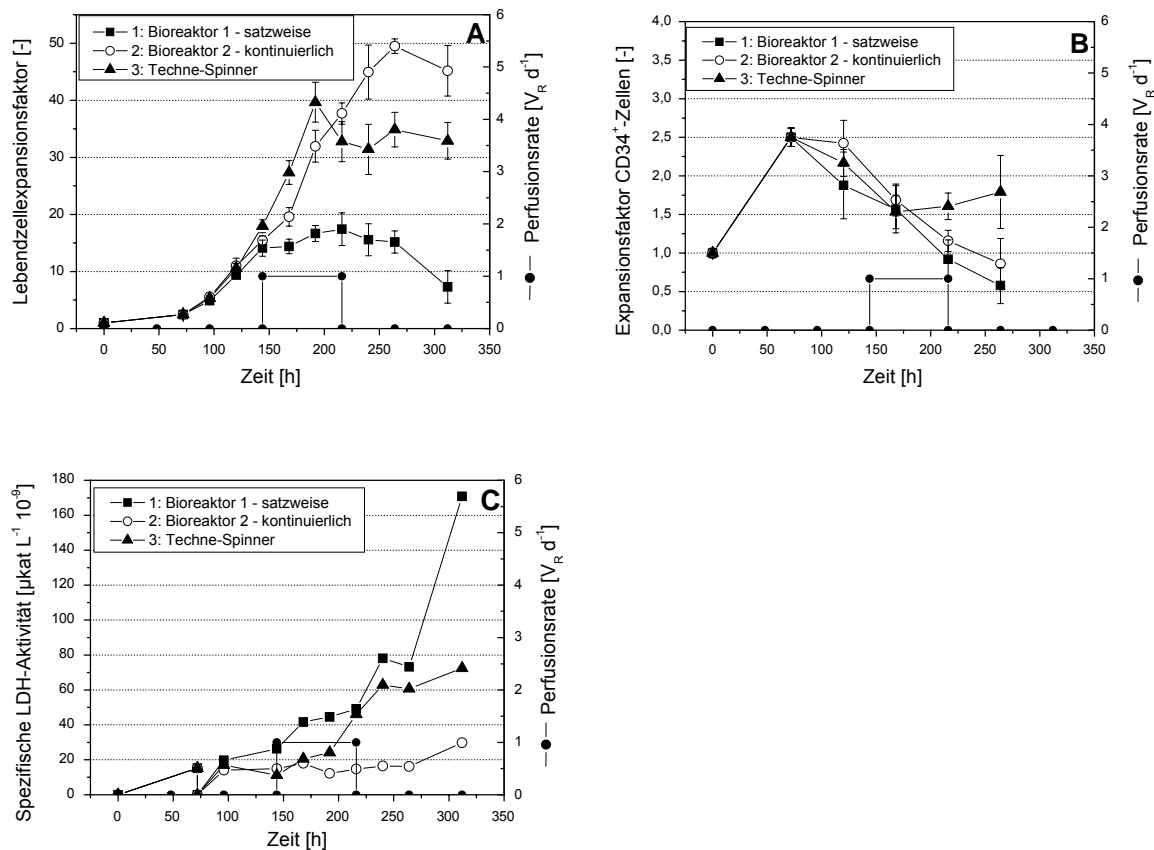


Abbildung 3.44: Einfluss der Kulturführungsstrategie und des Kulturgefäßes auf den zeitlichen Verlauf der Lebendzellexpansion (A), den Expansionsfaktor CD34⁺-Zellen (B) und der spezifischen LDH-Aktivität (C). Alle Ansätze wurden mit $1 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$ aufgereinigten CD34⁺-Zellen inokuliert. Auf der rechten Ordinate ist die Perfusionsrate in Reaktorvolumen pro Tag [$V_R \cdot d^{-1}$] aufgetragen.

In Abbildung 3.44 C ist die auf die Gesamtzellzahl bezogene LDH-Aktivität im Kulturüberstand gegen die Zeit aufgetragen. Trotzdem die LDH-Aktivität nur in einem der beiden Versuchsansätze bestimmt werden konnte, bestätigt sie abermals die niedrigeren Werte für die Techne-Spinnerkulturen (Median_{Bioreaktor1-Spinner}: -19%, Min.: -6%, Max.: -57%). Die spezifische LDH-Aktivität im Ansatz Bioreaktor 2 ist über den Kulturzeitraum betrachtet auf dem niedrigsten Niveau, was auf die Medienperfusion zurückzuführen werden kann, da die Perfusionsmembran keinen Widerstand gegen Proteine dieser Größe (Quelle: ExPASy, Molekulargewicht humane LDH: 140 kDa) bildet. Die Entwicklung der erythrozytären Vorläufer (Abb. 3.45 A) zeigte für alle Ansätze eine Zunahme dieser Zellen auf vergleichbare maximale Expansionswerte;

in den Ansätzen 2 und 3 ca. 15 ± 3 -fach bzw. für Ansatz 1 10 ± 4 -fach. Nach 168 h Kultur verringerte sich der Gehalt an BFU- und CFU-E in allen Ansätzen. In den Ansätzen 2 und 3 konnten die erythrozytären Vorläuferzellen zwischen 168 und 264 h Kultur deutlich besser erhalten werden als im Ansatz 1 der satzweisen Kultur, deren Gehalt auf das Niveau des Inokulums sank.

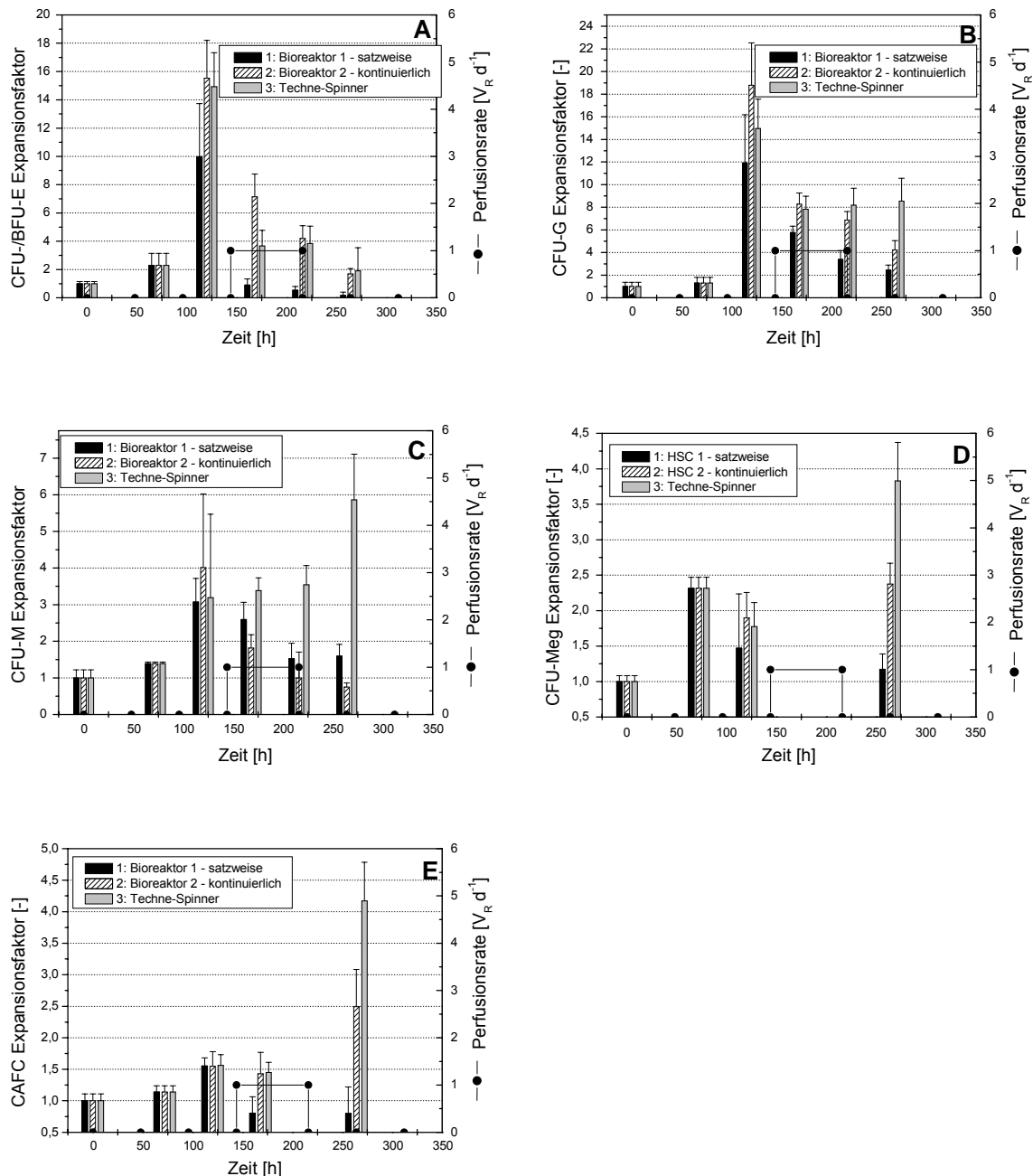


Abbildung 3.45: Einfluss der Kulturführungsstrategie und des Kulturgefäßes auf den zeitlichen Verlauf der Expansion der erythrozytären Vorläuferzellen (A), den Expansionsfaktor der granulozytären Vorläuferzellen (B), den Expansionsfaktor der monozytären Vorläufer (C), der megakaryozytären Vorläufer (D) und der CAFC (E).

Die Entwicklung der granulozytären Vorläuferzellen verlief absolut analog (Abb. 3.45 B). Bis zu 120 h Kultur konnte eine kontinuierliche Zunahme der Zellen in allen Ansätzen in einen Bereich zwischen 12- und 18-fach gezeigt werden. Danach sank der Gehalt in allen Ansätzen wieder. Am stärksten war dies in Ansatz 1 zu beobachten, wo nach 264 h gegenüber der Ausgangspopulation lediglich eine verdreifachte Menge an CFU-G übrige blieb. Während in der Spinnerkultur bis zum Ende des Beobachtungszeitraums eine 8-fache Expansion aufrechterhalten werden konnte, sank die Zellzahl in kontinuierlicher Kultur nach 264 h auf den Expansionsfaktor 5 ab. Die Analyse der Subpopulation der monozytären Vorläuferzellen zeigt deutliche Vorteile für die Kultur in der Techne-Spinnerflasche (Abb. 3.45 C). Nach 120 h Kultur expandierte dieser Zelltyp in Ansatz 3 bis zur 6-fachen Zellzahl, während die CFU-M Zellzahl in den Bioreaktoransätzen nach anfänglich noch vergleichbarer Zunahme anschließend kontinuierlich und vergleichbar auf den Expansionsfaktor 1 bis 2 abfällt. Auch die Entwicklung der megakaryozytären Vorläuferzellen (Abb. 3.45 D) offenbarte im späteren Kulturverlauf Vorteile für die Spinnerflasche. Nach vergleichbarem frühem Kulturverlauf kann man nach 264 h Kultur eine 5-fache Expansion nachweisen. Die Analyse der CAFC als Funktion der Zeit zeigte einen Vorteil für die Kulturen 2 und 3. Bis 120 und 168 h Kultur konnte der Inokulum-Gehalt lediglich in den Ansätzen 2 und 3 erhalten werden (Abb. 3.45 E). Die Ergebnisse nach 264 h bestätigten mit 2,5- und 4-fachen Expansion die erkennbaren Vorteile für die Ansätze 2 und 3. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte eindeutig bestätigt werden, dass kontinuierliche Medienperfusion einen positiven Effekt auf die Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen hat. Damit ist eine permanente Zufuhr von Nährstoffen und die simultane Entfernung von Metaboliten gewährleistet und somit die Akkumulation von toxischen metabolischen Produkten verhindert (Gloeckner und Lemke, 2001; Koller et al., 1998a; Palsson et al., 1993). Die gewählte Strategie der Medienperfusion mit Zellrückhaltung war geeignet, das Ergebnis des Vergleichsansatzes im Batchbetrieb hinsichtlich aller untersuchten Subpopulationen zu übertreffen. Eine detaillierte Analyse der frühen und reifen Vorläuferzellen, die zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung möglich war, offenbarte jedoch weiterhin Vorteile für die Techne-Spinnerflasche. Nur für die erythrozytären Vorläuferzellen werden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine transiente Expansion von CD34-selektierten peripheren Blutstammzellen und von

frühen und reifen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen mit dem verwendeten Bioreaktorsystem möglich ist. Collins und Mitarbeiter konnten zeigen, dass durch die Optimierung der Kulturführungsstrategie in einem gerührten System (Biostat Q, B. Braun, Melsungen, 250 mL Arbeitsvolumen, Bellco-Spinner 1965-250 mit Kunststoff-Rührer) eine Gesamtzellexpansion, CFU-GM-Expansion und Expansion von CD34-positiven Zellen isoliert aus peripherem Blut erreicht werden kann (Collins et al., 1998a). Durch Ergänzung der Medienperfusion inkl. Zellerückhaltung mit einer definierten Bleedingrate an Zellen konnten Ergebnisse für die Gesamtzellzahl von 300-fach und für CFU-GM von 15-fach erreicht werden. Auch Kim hat in Bellco-Spinnern (Modell 1965-250) die erfolgreiche Expansion der Gesamtzellzahl und CFU-GM basierend auf mononukleären Fraktionen von Knochenmarkproben zeigen können (Kim, 1998). Unter täglichem Medienwechsel mit Zellerückhaltung wurden Expansionsfaktoren für die Gesamtzellzahl bis 12-fach und für CFU-GM von 9-fach erreicht. Frühe Vorläuferzellen, wie CAFC oder LTC-IC wurden nicht bestimmt. Ein umfangreicher Vergleich zwischen verschiedenen Kultursystemen ist bei Sardonini und Wu zu finden (Sardonini und Wu, 1993). Sie untersuchten vergleichend anhand von mononukleären Zellen aus Knochenmarksaspiraten die Gesamtexpansion in statischer Kultur (6-Loch-Platte), Suspensionskultur (Bellco-Spinner, Modell 1965-250), Microcarrier-Airlift-Reaktor-Kultur und einer Hollow-Fiber-Modul-Kultur. Die im Spinner erreichte Expansion mit täglicher Medienperfusion und Zellverdünnung betrug 15-fach und lag damit über den Ergebnissen der statischen Kultur. Die anderen beiden Systeme konnten aufgrund der schwierigen Zellernte bei der Verwendung von immobilisierenden Systemen (Abschnitt 1.4.5.1) während der Kultivierungsphase nur indirekt überwacht werden.

Um eine weitere Verbesserung der Kulturleistung über eine Reduktion der auf die Zellen einwirkenden Scherkräfte zu erreichen, können eine Reihe von Parametern verändert werden. Zunächst wäre der Einsatz von weiteren scherprotektiven Substanzen, auch in Kombination zu prüfen. Weiterhin müssen auch Veränderungen in der Reaktorgeometrie untersucht werden. Durch die Geometrie des Reaktorgefäßes in Form eines Konus entsteht zwischen den Rührerspitzen und der Gefäßwand ein enger Spalt durch den die Zellsuspension bei abwärtsgerichteter Strömung wieder aufsteigen muss. Um hohe Geschwindigkeiten in diesem Wandbereich zu verhindern, muss der Abstand vergrößert werden. Dies kann über

eine Veränderung des Winkels des konusförmigen Gefäßes oder über einen kleineren Rührer realisiert werden. Ersteres führt zwangsläufig zu einer Verschlechterung des Oberflächen-Flüssigkeitsvolumen-Verhältnisses und damit zu einem verringerten Sauerstoffeintrag über den Kopfraum. Diese Verminderung muss dann durch in Abschnitt 3.10.2.3 genannten Maßnahmen kompensiert werden. Ein weiteres zentrales Ergebnis der Experimente mit primären Zellen war der eindeutige Nachweis der prinzipiellen Eignung des selbst entwickelten Bioreaktorsystems und damit aller Komponenten und der verwendeten Materialien. Bereits McAdams und Mitarbeiter verwiesen auf die Notwendigkeit der individuellen Testung der Materialien bei der Entwicklung neuer Kultursysteme für hämatopoetische Zellen (McAdams et al., 1996b). Laluppa und Mitarbeiter haben in ihrer 1997 veröffentlichten Arbeit erstmals die Biokompatibilität einer Vielzahl von Materialien zur Kultur von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zeigen können (Laluppa et al., 1997). Sie untersuchten dabei die direkte und lösungsvermittelte Wirkung von 15 Kunststoffen, 4 Metallsorten und Glas relativ zu Zellkultur-behandeltem Polystyrol auf die Gesamt- und CFU-GM-Zahl von CD34⁺- und PBMNC-Zellkulturen. Sie zeigten, dass Edelstahl sowohl im direkten Kontakt als auch über die Lösung von Materialbestandteilen (z. B. Metallionen und anderen Beimengungen) generell als kritisch zu bewerten ist und die Biokompatibilität im Einzelfall vorher zu testen ist. Bei Titan war kein signifikanter Einfluss zu erkennen. Für eine Reihe von Kunststoffen, darunter PTFE, Acetal, PE, PP oder Polysulfon konnte Inkompatibilität demonstriert werden. Diese negative Wirkung konnte, im Fall des Polycarbonats demonstriert, durch die Zugabe von Serum teilweise kompensiert werden. Weiterhin wurde den gängigsten Schlauch- und Pumpenschlauchmaterialien (Silicone, Viton, C-Flex und PTFE) eine Bioinkompatibilität nachgewiesen. PEEK (Deckel und Deckelportmaterial), 1.4434 ein nicht-rostender Edelstahl (Sondenmaterial) und Schott-Glas (Reaktorgefäß), die drei Hauptmaterialien des in dieser Arbeit verwendeten Bioreaktors, wurden bisher nicht untersucht, scheinen aber aufgrund der vorliegenden Ergebnisse im Hinblick auf die betrachteten Subpopulationen kompatibel.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

Die Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen stellt ein wichtiges interdisziplinäres Forschungsgebiet an der Grenze zwischen den medizinischen Fachgebieten der Transfusionsmedizin und Hämatologie/Onkologie sowie der modernen Zellkulturtechnik dar. Die Quellen hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen sind stark limitiert. Ein *ex vivo* Kultursystem zur Amplifizierung hämatopoetischer Progenitorzellen könnte helfen die verfügbaren Quellen besser auszuschöpfen und neue zu erschließen. Das primäre Interesse dieser Arbeit galt der Expansion von adulten hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus peripherem Blut.

Über den direkten Vergleich von fünf kommerziell erhältlichen Basalmedien konnte StemSpan SFM als das Medium identifiziert werden, welches die höchste Expansion von sowohl Gesamtzellen, CD34-positiven Zellen als auch von frühen und reifen Vorläuferzellen ermöglicht. Über eine detaillierte Aminosäureanalyse konnten mit L-Serin und L-Asparaginsäure zwei limitierende Aminosäuren dieses Mediums identifiziert werden, durch entsprechende Supplementierung die Formulierung verbessert und die Expansionsleistung signifikant gesteigert werden.

Nach der Identifizierung von SCF und Interleukin-3 als Wachstumsfaktoren mit den stärksten proliferativen Eigenschaften, wurde im Hinblick auf den erwarteten großen Verbrauch im Rahmen dieser Arbeit die Entscheidung getroffen, diese beiden Proteine selbstständig auf der Basis des Baculovirus-Expressionssystems herzustellen, aufzureinigen und detailliert zu charakterisieren. Das Ergebnis waren hochreine Fraktionen aktiven Proteins, die hinsichtlich ihrer spezifischen, biologischen Aktivität die bakteriell exprimierten kommerziellen Proteine übertrafen. Auch die Notwendigkeit einer permanenten Stimulation mit Wachstumsfaktoren über den gesamten Kulturzeitraum konnte eindeutig nachgewiesen werden. Zur Abschätzung des Potentials von Zell-Zell-kontaktfreien Kokultivierungsstrategien als Alternative zum Einsatz von rekombinanten Wachstumsfaktoren, wurden konditionierte Zellkulturüberstände verschiedener primärer Zelltypen und kontinuierlicher Zelllinien erzeugt. Auch wenn die messbaren Effekte hinter den

Erwartungen zurückblieben, konnte eine Stimulation gezeigt werden. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag auf dem Einsatz und der Weiterentwicklung eines neuartigen gemeinsam mit der Firma Meredos entwickelten miniaturisierten, vollkontrollierten Bioreaktorsystems und seiner Komponenten (insbesondere: Rührergeometrie, Reaktorgefäß und Gelöstsauerstoff-Partialdruck-Elektroden), das zur submersen Kultivierung von Stamm- und Vorläuferzellen eingesetzt werden sollte. Zunächst wurde das System verfahrenstechnisch hinsichtlich der Mischzeit und des k_{La} -Wertes charakterisiert. Dann wurde die prinzipielle Eignung anhand zweier hämatopoetischer Modellzelllinien demonstriert. In den initialen Kultivierungen wurde der Drehzahlbereich optimiert und auftretende Scherkräfte als kritisch eingestuft, da die Expansionsleistung des Vergleichskulturgefäßes, einer 125 mL Techne-Spinnerflasche, hinsichtlich einiger analysierter Subpopulationen früher und reifer Vorläuferzellen nicht erreicht wurden. Zur Reduzierung der auftretenden Scherkräfte, die als Haupteinflussfaktor identifiziert werden konnten, wurde der scherprotektive Zellkulturzusatz Pluronic F-68 geprüft und die prinzipielle Eignung und Biokompatibilität demonstriert. Abschließend sollte dann die Expansionsleistung durch die Strategie der Medienperfusion mit Zellrückhaltung weiter verbessert werden. In der Tat war die kontinuierliche Kultur geeignet den parallel betriebenen Bioreaktor und auch die Techne-Spinnerflasche in Batchkultur hinsichtlich der Expansion einiger Subpopulationen von Vorläuferzellen zu übertreffen.

Mit den in der vorliegenden Arbeit erarbeiteten Grundlagen zu Kulturmedien, Kulturzusätzen, den gewonnenen Erkenntnissen zur Optimierung der Kulturführungsstrategie besonders in Kombination mit dem neuartigen miniaturisierten Bioreaktorsystem, wurde eine gute Basis für weiterführende Experimente unter kontrollierten Bedingungen geschaffen.

4.2 *Ausblick*

Seit Anfang der 1990er Jahre finden *ex vivo* expandierte Zellen aus Knochenmark, Nabelschnur- und Plazentarestblut sowie peripherem Blut Verwendung in klinischen Studien (Devine et al., 2003). Sie werden eingesetzt als Ergänzung oder unabhängig von den klassischen Transplantatformen. Dabei wurden zunächst einfache Systeme, wie z. B. gasdurchlässige Kulturbeutel, unter Zusatz von komplexen, undefinierten Supplementen, wie tierischem Serum, in Batchkultur eingesetzt. Die Rolle der

modernen Zellkulturtechnik hat bei der Erzeugung von kontrollierten physiologischen Umgebungsbedingungen in komplexen Kultursystemen in den letzten Jahren immer weiter an Bedeutung zugenommen. Der Autor sieht eine Reihe von Einsatzgebieten für das untersuchte miniaturisierte Bioreaktorsystem in der Testung neuer Substanzen entsprechend dem Prinzip des High-Throughput-Screenings z. B. zur Eliminierung uncharakterisierter Mediensupplemente oder zur Evaluierung neuer Wachstumsfaktoren. Eine Reduktion der im Vergleich zur Spinnerflasche höheren Scherkräfte, etwa durch Anpassung von Rührergeometrie, Reaktorform- und -abmessungen, konnte in dem vorgesehen Zeitraum nicht mehr durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Strategien zur Kulturführung entwickelt und deren Vorteile bewertet. Das zur Kontrolle der Bioreaktoren eingesetzte frei programmierbare „mfs“-System bietet eine Reihe von Möglichkeiten die untersuchten Kulturführungsstrategien zu kombinieren oder weiter anzupassen. Daher sind Kombinationen und Abfolgen aus Batch-, Fedbatch- sowie Perfusions-Kultur mit freiwählbarer „Bleeding“-Rate denkbar. Eine interessante Weiterentwicklung des Systems sieht die Kombination aus einem durchströmten mit autologen Stromazellen besiedelten Festbettreaktor-Einsatz und paralleler Suspensionskultur von Stammzellen vor. Die eigenen Ergebnisse haben eindeutig bestätigt, dass eine Expansion von adulten Stammzellen ohne einen gleichzeitigen Verlust des Stammzellcharakters nicht zu erreichen ist. Es bietet sich daher die Definition eines maximal akzeptablen Differenzierungsgrads an, gleichbedeutend mit einem Abbruch der Kultur oder einem Wechsel der Kulturführungsstrategie nach einer initialen Expansionsphase. Derartige sensitive Analysen des Stammzellcharakters einzelner Zellen sind nicht mit *in vitro* Methoden zu leisten. An dieser Stelle sind Tierversuche angezeigt. Die Optimierung zellbasierter Strategien zur Behandlung hämatologischer Erkrankungen kann nur durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Medizin, Biologie und Zellkulturtechnologie erreicht werden, da neben der Funktionalität des Transplantats auch arzneimittelrechtliche Auflagen beachtet werden müssen.

5 Literaturverzeichnis

Abels, R.I., Rudnick, S.A.. Erythropoietin: evolving clinical applications. Exp. Hematol. 1991; 19(8):842-50.

Ahmed, N., Khokher, M.A., Hassan, H.T.. Cytokine-induced expansion of human CD34+ stem/progenitor and CD34+CD41+ early megakaryocytic marrow cells cultured on normal osteoblasts. Stem Cells 1999; 17(2):92-9.

Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, M.G., Bordignon, C.. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. Science 2002; 296(5577):2410-3

Alcorn, M.J., Holyoake, T.L.. Ex vivo expansion of haemopoietic progenitor cells. Blood Rev. 1996; 10(3):167-76.

Alcorn, M.J., Holyoake, T.L., Richmond, L., Pearson, C., Farrell, E., Kyle, B., Dunlop, D.J., Fitzsimons, E., Steward, W.P., Pragnell, I.B., Franklin, I.M.. CD34-positive cells isolated from cryopreserved peripheral-blood progenitor cells can be expanded ex vivo and used for transplantation with little or no toxicity. J. Clin. Oncol. 1996; 14(6):1839-47.

Almeida-Porada, G., Brown, R.L., MacKintosh, F.R., Zanjani, E.D.. Evaluation of serum-free culture conditions able to support the ex vivo expansion and engraftment of human hematopoietic stem cells in the human-to-sheep xenograft model. J. Hematother. Stem Cell Res. 2000; 9(5):683-93.

Al-Rubeai, M., Oh, S.K., Musaheb, R., Emery, A.N.. Modified cellular metabolism in hybridomas subjected to hydrodynamic and other stresses. Biotechnol. Lett. 1990; 12:323-28.

Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J.J., Godia, F.. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. Biotechnol. Prog. 2000; 16(1):69-75.

Ando, K., Nakamura, Y., Chargui, J., Matsuzawa, H., Tsuji, T., Kato, S., Hotta, T.. Extensive generation of human cord blood CD34(+) stem cells from Lin(-)CD34(-) cells in a long-term in vitro system. Exp. Hematol. 2000; 28(6):690-9.

Andrews, R.G., Bryant, E.M., Bartelmez, S.H., Muirhead, D.Y., Knitter, G.H., Bensinger, W., Strong, D.M., Bernstein, I.D.. CD34+ marrow cells, devoid of T and B lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated allogeneic baboons. Blood 1992; 80(7):1693-701.

Bachier, C.R., Gokmen, E., Teale, J., Lanzkron, S., Childs, C., Franklin, W., Shpall, E., Douville, J., Weber, S., Muller, T., Armstrong, D., LeMaistre, C.F.. Ex-vivo expansion of bone marrow progenitor cells for hematopoietic reconstitution following high-dose chemotherapy for breast cancer. Exp. Hematol. 1999; 27(4):615-23.

Bagley, J., Rosenzweig, M., Marks, D.F., Pykett, M.J.. Extended culture of multipotent hematopoietic progenitors without cytokine augmentation in a novel three-dimensional device. Exp. Hematol. 1999; 27(3):496-504.

Bahlmann, F.H., de Groot, K., Haller, H., Fliser, D.. Erythropoietin: is it more than correcting anaemia? Nephrol. Dial. Transplant. 2004; 19(1):20-2.

Baker, H., DeAngelis, B., Frank, O.. Vitamins and other metabolites in various sera commonly used for cell culturing. Experientia 1988; 44(11-12):1007-10.

Banu, N., Rosenzweig, M., Kim, H., Bagley, J., Pykett, M.. Cytokine-augmented culture of haematopoietic progenitor cells in a novel three-dimensional cell growth matrix. Cytokine 2001; 13(6):349-58.

Barnes, D., Sato, G.. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. Anal. Biochem. 1980; 102:255-70.

Barnes, D.W., Loutit, J.F.. What is the recovery factor in spleen? Nucleonics 1954; 12:68-71.

Barnes, D.W., Ford, C.E., Ilbery, P.L., Koller, P.C., Loutit, J.F.. Tissue transplantation in the radiation chimera. J. Cell Physiol. 1957; 50(1):123-38.

Beck, C., Nguyen, X.D., Kluter, H., Eichler, H.. Effect of recombinant human deoxyribonuclease on the expression of cell adhesion molecules of thawed and processed cord blood hematopoietic progenitors. Eur. J. Haematol. 2003; 70(3):136-42.

Bensinger, W., Appelbaum, F., Rowley, S., Storb, R., Sanders, J., Lilleby, K., Gooley, T., Demirer, T., Schiffman, K., Weaver, C.. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. J. Clin. Oncol. 1995; 13(10):2547-55.

Berthier, R., Valiron, O., Schweitzer, A., Marguerie, G.. Serum-free medium allows the optimal growth of human megacaryocyte progenitors compared with human plasma supplemented cultures: role of TGF beta. Stem Cells 1993; 11(2):120-9.

Bender, J.G., Unverzagt, K.L., Walker, D.E., Lee, W., Van Epps, E.D., Smith, D.H., Stewart, C.C., To, L.B.. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. Blood 1991; 77(12):2591-6.

Bertolini, F., Battaglia, M., Soligo, D., Corsini, C., Curioni, C., Lazzari, L., Pedrazzoli, P., Thalmeier, K.. "Stem cell candidates" purified by liquid culture in the presence of Steel factor, IL-3, and 5FU are strictly stroma-dependent and have myeloid, lymphoid, and megakaryocytic potential. Exp. Hematol. 1997; 25(4):350-6.

Bertram, S. und Gassen, H.G. (Hrsg.). *Gentechnische Methoden*, Gustav-Fischer-Verlag, 1991

Bhatia, R., McGlave, P.B.; Miller, J.S., Wissink, S., Lin, W.N., Verfaillie, C.M.. A clinically suitable ex vivo expansion culture system for LTC-IC and CFC using stroma-conditioned medium. Exp. Hematol. 1997; 25(9):980-91.

Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O.I., Dick, J.E.. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. Nat. Med. 1998; 4(9):1038-45.

Bird, R.M., Clements, J.A., Becker, L.M.. The metabolism of leukocytes taken from peripheral blood of leukemic patients. Cancer 1951; 4:1009-14.

Bjare, U.. Serum-free cell culture. Pharmacol. Ther. 1992; 53(3):355-74.

Blair, A., Hogge, D.E., Ailles, L.E., Lansdorp, P.M., Sutherland, H.J.. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. Blood 1997; 89(9):3104-12.

Böldicke, T., Tesar, M., Griesel, C., Rohde, M., Grone, H.J., Waltenberger, J., Kollet, O., Lapidot, T., Yayon, A., Weich, H.. Anti-VEGFR-2 scFvs for cell isolation. Single-chain antibodies recognizing the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the surface of primary endothelial cells and preselected CD34+ cells from cord blood. Stem Cells 2001; 19(1):24-36

Bonnefoix, T., Sotto, J.J.. A program for computing the results of limiting dilution experiments. J. Immunol. Methods 1991; 144:145.

Borge, O.J., Ramsfjell, V., Cui, L., Jacobsen, S.E.. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. Blood 1997; 90(6):2282-92.

Boza, J.J., Maire, J., Bovetto, L., Balleve, O.. Plasma glutamine response to enteral administration of glutamine in human volunteers (free glutamine versus protein-bound glutamine). Nutrition 2000; 16(11-12):1037-42.

Bradley, T.R., Hodgson, G.S., Rosendaal, M.. The effect of oxygen tension on haemopoietic and fibroblast cell proliferation in vitro. J. Cell Physiol. 1978; 97(1):517-22.

Brandt, J.E., Bhalla, K., Hoffman, R.. Effects of interleukin-3 and c-kit ligand on the survival of various classes of human hematopoietic progenitor cells. Blood 1994; 83(6):1507-14.

Brandt, J.E., Galy, A.H., Luens, K.M., Travis, M., Young, J., Tong, J., Chen, S., Davis, T. A., Lee, K.P., Chen, B.P., Tushinski, R., Hoffman, R.. Bone marrow repopulation by human marrow stem cells after long-term expansion culture on a porcine endothelial cell line. Exp. Hematol. 1998; 26(10):950-61.

Breems, D.A., Blokland, E.A., Neben, S., Ploemacher, R.E.. Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay. Leukemia 1994; 8(7):1095-104.

Breems, D.A., Blokland, E.A., Ploemacher, R.E.. Stroma-conditioned media improve expansion of human primitive hematopoietic stem cells and progenitor cells. Leukemia 1997; 11(1):142-50.

Brown, G., Jones, N.A., Bunce, C.M., Lord, J.M., Owen, P.J., Patton, W.N.. Haematopoiesis: A lottery or genome determinism? Br. J. Haematol. 1991; 79:527-534.

Brugger, W., Mocklin, W., Heimfeld, S., Berenson, R.J., Mertelsmann, R., Kanz, L.. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. Blood 1993; 81(10):2579-84.

Brugger, W., Heimfeld, S., Berenson, R.J., Mertelsmann, R., Kanz, L.. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. N. Engl. J. Med. 1995; 333(5):283-7.

Burroughs, J., Gupta, P., Blazar, B.R., Verfaillie, C.M.. Diffusible factors from the murine cell line M2-10B4 support human in vitro hematopoiesis. Exp. Hematol. 1994; 22(11):1095-101.

Cairo, M.S., Wagner, J.E.. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. Blood 1997; 90(12):4665-78.

Cameron, C.M., Hu, W.S., Kaufman, D.S.. Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation. Biotechnol. Bioeng. 2006; 94(5):938-48.

Candal, F.J., Rafii, S., Parker, J.T., Ades, E.W., Ferris, B., Nachman, R.L., Kellar, K.L.. BMEC-1: a human bone marrow microvascular endothelial cell line with primary cell characteristics. Microvasc. Res. 1996; 52(3):221-34.

Carswell, K.S., Papoutsakis, E.T.. Culture of Human T Cells in Stirred Bioreactors for Cellular Immunotherapy Applications: Shear, Proliferation, and the IL-2 Receptor. Biotechnol. Bioeng. 2000; 68(3):328-38.

Case, J., Rice, A., Wood, J., Gaudry, L., Vowels, M., Nordon, R.E.. Characterization of cytokine interactions by flow cytometry and factorial analysis. Cytometry 2001; 43(1):69-81.

Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H.E., Moore, M.A.. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. Blood 1980; 56(2):289-301.

Chabannon, C., Cornetta, K., Lotz, J.P., Rosenfeld, C., Shlomchik, M., Yanovitch, S., Marolleau, J.P., Sledge, G., Novakovitch, G., Srour, E.F., Burtness, B., Camerlo, J., Gravis, G., Lee-Fischer, J., Faucher, C., Chabbert, I., Krause, D., Maraninchi, D., Mills, B., Kunkel, L., Oldham, F., Blaise, D., Viens, P.. High-dose chemotherapy followed by reinfusion of selected CD34+ peripheral blood cells in patients with poor-prognosis breast cancer: a randomized multicentre study. Br. J. Cancer 1998; 78(7):913-21.

Chabannon, C., Blache, J.L., Sielleur, I., Douville, J., Faucher, C., Gravis, G., Arnoulet, C., Oziel-Taieb, S., Blaise, D., Novakovitch, G., Novakovitch, G., Camerlo, J., Chabbert, I., Genre, D., Appel, M., Armstrong, D., Maraninchi, D., Viens, P.. Production of ex vivo expanded hematopoietic cells and progenitors in a closed bioreactor, starting with a small volume marrow collection: A feasibility study in patients with poor-risk breast cancer and receiving high-doses of cyclophosphamide. Int. J. Oncol. 1999 ; 15(3) :511-8.

Champlin, R.. Optimizing the composition of bone marrow for allogenic transplantation. J. Hematother. 1995; 4(1):53-60.

Chico, E., Jäger, V.. Perfusion culture of baculovirus-infected BTI-Tn-5B1-4 insect cells: a method to restore cell-specific beta-trace glycoprotein productivity at high cell density. Biotechnol. Bioeng. 2000; 70(5):574-86.

Chute, J.P., Muramoto, G.G., Dressman, H.K., Wolfe, G., Chao, N.J., Lin, S.. Molecular profile and partial functional analysis of novel endothelial cell-derived growth factors that regulate hematopoiesis. Stem Cells 2006, 24(5):1315-27.

Civin, C.I., Strauss, L.C., Shaper, J.-H.. Antigenic analysis of hematopoiesis: III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. J. Immunol. 1984; 133(1):157-65.

Collins, P.C., Nielsen, L.K., Wong, C.-K., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M.. Real-time method for determining the colony-forming cell content of human hematopoietic cell cultures. Biotechnol. Bioeng. 1997; 55: 693-700.

Collins, P.C., Nielsen, L.K., Patel, S.D., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M.. Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake, and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system. Biotechnol. Prog. 1998a; 14(3):466-72.

Collins, P.C., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T.. Stirred culture of peripheral and cord blood hematopoietic cells offers advantages over traditional static systems for clinically relevant applications. Biotechnol. Bioeng. 1998b; 59(5):534-43.

Collins, S.J., Gallo, R.C., Gallagher, R.E.. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. Nature 1977; 270(5635):347-9.

Conneally, E., Cashman, J., Petzer, A., Eaves, C.. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997; 94(18):9836-41.

Conrad, P.D., Emerson, S.G.. Ex vivo expansion of hematopoietic cells from umbilical cord blood for clinical transplantation. J. Leukoc. Biol. 1998; 64(2):147-55.

Cormier, F., Baines, P., Lucien, N., Boffa, G.A.. Complete replacement of serum in cultures of murine primitive erythroid and multipotential progenitor cells: absolute requirement for spleen conditioned medium. Cell Differ. 1985; 17(4):261-9.

Cotner, T., Gupta, A.D., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G.. Characterization of a novel form of transferrin receptor preferentially expressed on normal erythroid progenitors and precursors. Blood 1989; 3(1):214-21.

Cotter, T.G., Fernandes, R.S., Verhaegen, S., McCarthy, J.V.. Cell Death in myeloid lineage. Immunol. Rev. 1994; 142: 93-112.

Cruz, H.J., Moreira, J.L., Carrondo, M.J.. Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. Biotechnol. Bioeng. 1999; 66(2):104-13.

Curtis, B.M., Williams, D.E., Broxmeyer, H.E., Dunn, J., Farrah, T., Jeffery, E., Clevenger, W., deRoos, P., Martin, U., Friend, D.. Enhanced hematopoietic activity of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-interleukin 3 fusion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991; 88(13):5809-13.

Da Silva, C.L., Goncalves, R., Crapnell, K.B., Cabral, J.M., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G.. A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. Exp. Hematol. 2005; 33(7):828-35.

Davis, T.R., Wickham, T.J., McKenna, K.A., Granados, R.R., Shuler, M.L., Wood, H.A.. Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1993; 29(5):388-90.

Davis, T.A., Black, A.T., Kidwell, W.R., Lee, K.P.. Conditioned medium from primary porcine endothelial cells alone promotes the growth of primitive human haematopoietic progenitor cells with a high replating potential: evidence for a novel early haematopoietic activity. Cytokine 1997a; 9(4):263-75.

Davis, T.A., Black, A.T., Lee, K.P.. Soluble factor(s) alone produced by primary porcine microvascular endothelial cells support the proliferation and differentiation of human CD34+ hematopoietic progenitor cells with a high replating potential. Transplant. Proc. 1997b; 29(4):2003-4.

De Bruyn, B.C., Delforge, A., Bron, D.. Ex vivo myeloid differentiation of cord blood CD34+ cells: comparison of four serum-free media containing bovine or human albumin. Cytotherapy 2003; 5(2):153-60.

De Haan, H.G., Dontje, B., Nijhof, W.. Concepts of hemopoietic cell amplification. Synergy, redundancy and pleiotropy of cytokines affecting the regulation of erythropoiesis. Leuk. Lymphoma 1996; 22(5-6):385-94.

De Lima, L.M., Shpall, E.J.. Ex-vivo purging of hematopoietic progenitor cells. Curr. Hematol. Rep. 2004; 3(4):257-64.

Denning-Kendall, P., Singha, S., Bradley, B., Hows, J.. Cytokine expansion culture of cord blood CD34+ cells induces marked and sustained changes in adhesion receptor and CXCR4 expressions. Stem Cells 2003; 21(1):61-70.

Devine, S.M., Lazarus, H.M., Emerson, S.G.. Clinical application of hematopoietic progenitor cell expansion: current status and future prospects. Bone Marrow Transplant. 2003; 31(4):241-52.

De Wynter, E.A., Coutinho, L.H., Pei, X., Marsh, J.C., Hows, J., Luft, T., Testa, N.G.. Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. Stem Cells 1995; 13(5):524-32.

Dexter, T.M., Lajtha, L.G.. Proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. Br. J. Haematol. 1974; 28(4):525-30.

Dexter, T.M., Testa, N.G.. Differentiation and proliferation of hemopoietic cells in culture. Methods Cell Biol. 1976a; 14:387-405.

Dexter, T.M., Allen, T.D., Lajtha, L.G.. Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells in vitro. J. Cell Physiol. 1976b; 91:335-44.

Dexter, T.M., Wright, E.G., Krizsa, F., Lajtha, L.G.. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. Biomedicine 1977; 27(9-10):344-9.

Dexter, T.M.. Blood cell development. The message in the medium. Nature 1984; 309(5971):746-7.

Ding, H., Griesel, C., Nimtz, M., Conradt, H.S., Weich, H.A., Jäger, V.. Molecular cloning, expression, purification, and characterization of soluble full-length, human interleukin-3 with a baculovirus-insect cell expression system. Protein Expr. Purif. 2003; 31(1):34-41.

Donnelly, M., Scheffler, I.E.. Energy metabolism in respiration-deficient and wild type Chinese hamster fibroblasts in culture. J. Cell Physiol. 1976; 89(1):39-51.

Donnenberg, A.D., Koch, E.K., Griffin, D.L., Stanczak, H.M., Kiss, J.E., Carlos, T.M., Buchbarker, D.M., Yeager, A.M.. Viability of cryopreserved BM progenitor cells stored for more than a decade. Cytotherapy 2002; 4(2):157-63.

Douay, L., Giarratana, M.C., Mary, J.Y., Gorin, N.C.. Interleukin 2 interacts with myeloid growth factors in serum-free long-term bone marrow culture. Br. J. Haematol. 1994; 86(3):475-82.

Drexler, H.G., Zaborski, M., Quentmeier, H.. Cytokine response profiles of human myeloid factor-dependent leukemia cell lines. Leukemia 1997; 11(5):701-8.

Drouet, X., Douay, L., Giarratana, M.C., Baillou, C., Gorin, N.C., Salmon, C., Najman, A.. Human liquid bone marrow culture in serum-free medium. Br. J. Haematol. 1989; 73(2):143-7.

Dube, S., Fisher, J.W., Powell, J.S.. Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. J. Biol. Chem. 1988; 263(33):17516-21.

Dührsen, U., Villeval, J.L., Boyd, J., Kannourakis, G., Morstyn, G., Metcalf, D.. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. Blood 1988; 72(6):2074-81.

Eagle, H.. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science 1955; 122(3168):501-14.

Eaves, C., Lambie, K.. Atlas of Human Hematopoietic Colonies. Product Information, StemCell Technologies, Vancouver, 1995.

Ehrlich, P.. Über die spezifischen Granulationen des Blutes. Archiv für Anatomie und Physiologie/ Physiologische Abteilung 1879; 571-579.

Einsele, A., Finn, R.K., Samhaber, W.. Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik; VCH – Wiley, Weinheim 1985.

Ende, M., Ende, N.. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. Va. Med. Mon. 1972; 99(3):276-80.

Engelhardt, M., Douville, J., Behringer, D., Jahne, A., Smith, A., Henschler, R., Lange, W.. Hematopoietic recovery of ex vivo perfusion culture expanded bone marrow and unexpanded peripheral blood progenitors after myeloablative chemotherapy. Bone Marrow Transplant. 2001; 27(3):249-59.

Fabricious-Moeller, J.. Experimental Studies on Haemorrhagic Diathesis from X-ray sickness. In Levin und Munksgaard, Copenhagen, 1922.

Felix, R., Elford, P.R., Stoerckle, C., Cecchini, M., Wetterwald, A., Trechsel, U., Fleisch, H., Stadler, B.M.. Production of hemopoietic growth factors by bone tissue and bone cells in culture. J. Bone Miner. Res. 1988; 3(1):27-36.

Feugier, P., Jo, D.Y., Shieh, J.H., MacKenzie, K.L., Rafii, S., Crystal, R.G., Moore, M. A.. Ex vivo expansion of stem and progenitor cells in co-culture of mobilized peripheral blood CD34+ cells on human endothelium transfected with adenovectors expressing thrombopoietin, c-kit ligand, and Flt-3 ligand. J. Hematother. Stem Cell Res. 2002; 11(1):127-38.

Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T.. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. J. Natl. Cancer Inst. 1977; 59(1):221-6.

Fraser, C.C., Kaneshima, H., Hansteen, G., Kilpatrick, M., Hoffman, R., Chen, B.P.. Human allogeneic stem cell maintenance and differentiation in a long-term multilineage SCID-hu graft. Blood 1995; 86(5):1680-93.

Frenette, P.S., Subbarao, S., Mazo, I.B., von Andrian, U.H., Wagner, D.D.. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998; 95(24):14423-8.

Freshney, R.I.. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. Alan R. Liss, New York, 1987.

Freshney, R.I., Pragnell, I.B., Freshney, M.G.. Culture of Hematopoietic Cells. Wiley-Liss: New York, 1994.

Gabbianelli, M., Pelosi, E., Montesoro, E., Valtieri, M., Luchetti, L., Samoggia, P., Vitelli, L., Barberi, T., Testa, U., Lyman, S.. Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. Blood 1995; 86(5):1661-70.

Gammaitoni, L., Bruno, S., Sanavio, F., Gunetti, M., Kollet, O., Cavalloni, G., Falda, M., Fagioli, F., Lapidot, T., Aglietta, M., Piacibello, W.. Ex vivo expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hemopoietic reconstitution. Exp. Hematol. 2003; 31(3):261-70.

Gartner, S., Kaplan, H.S.. Long-term culture of human bone marrow cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1980; 77(8):4756-9.

Ghebeh, H., Handa-Corrigan, A., Butler, M.. Development of an assay for the measurement of the surfactant Pluronic F-68 in mammalian cell culture medium. Anal. Biochem. 1998; 262(1):39-44.

Gilbertson, J.A., Sen, A., Behie, L.A., Kallos, M.S.. Scaled-up production of mammalian neural precursor cell aggregates in computer-controlled suspension bioreactors. Biotechnol. Bioeng. 2006; 94(4):783-92.

Gloeckner, H., Lemke, H.D.. New miniaturized hollow-fiber bioreactor for in vivo like cell culture, cell expansion, and production of cell-derived products. Biotechnol. Prog. 2001; 17(5):828-31.

Gluckman, E.G., Roch, V.V., Chastang, C.. Use of Cord Blood Cells for Banking and Transplant. Oncologist 1997; 2(5):340-3.

Gluckman, E., Rocha, V.. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells. Cytotherapy 2005; 7(3):219-27.

Goerner, M., Roecklein, B., Torok-Storb, B., Heimfeld, S., Kiem, H.P.. Expansion and transduction of nonenriched human cord blood cells using HS-5 conditioned medium and FLT3-L. J. Hematother. Stem Cell Res. 2000; 9(5):759-65.

Gokmen, E., Bachier, C., Raaphorst, F.M., Muller, T., Armstrong, D., Lemaistre, C.F., Teale, J.M.. Ex vivo-expanded hematopoietic cell graft recipients exhibit T cell repertoire diversity similar to that seen after conventional stem cell transplants. J. Hematother. Stem Cell Res. 2001; 10(1):53-66.

- Goncalves, R., Lobato da Silva, C., Cabral, J.M., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G.. A Stro-1(+) human universal stromal feeder layer to expand/maintain human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in a serum-free culture system. Exp. Hematol. 2006; 34(10):1353-9.
- Goodell, M.A., Rosenzweig, M., Kim, H., Marks, D.F., DeMaria, M., Paradis, G., Grupp, S.A., Sieff, C.A., Mulligan, R.C., Johnson, R.P.. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. Nat. Med. 1997; 3(12):1337-45.
- Graber, S.E., Krantz, S.B.. Erythropoietin: biology and clinical use. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 1989; 3(3):369-400.
- Gratama, J.W., Kraan, J., Keeney, M., Sutherland, D.R., Granger, V., Barnett, D.. Validation of the single-platform ISHAGE method for CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. Cytotherapy 2003; 5(1):55-65.
- Guerriero, A., Worford, L., Holland, H.K., Guo, G.R., Sheehan, K., Waller, E.K.. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. Blood 1997; 90(9):3444-55.
- Guilbert, L.J., Iscove, N.N.. Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. Nature 1976; 263(5578):594-5.
- Guo, Y., Lubbert, M., Engelhardt, M.. CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies. Stem Cells 2003; 21(1):15-20.
- Gupta, P., McCarthy, J.B., Verfaillie, C.M.. Stromal fibroblast heparan sulfate is required for cytokine-mediated ex vivo maintenance of human long-term culture-initiating cells. Blood 1996; 87(8):3229-36.
- Hacein-Bey-Abina, S., B.A., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M.. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. Int. J. Hematol. 2002; 76(4):295-8.
- Hale, G., Slavin, S., Goldman, J.M., Mackinnon, S., Giralt, S., Waldmann, H.. Alemtuzumab (Campath-1H) for treatment of lymphoid malignancies in the age of nonmyeloablative conditioning? Bone Marrow Transplant. 2002; 30(12):797-804.
- Hale, G.. Alemtuzumab in stem cell transplantation. Med. Oncol. 2002; 19:33-47.
- Ham, R.G.. Nutritional requirements of primary cultures. A neglected problem of modern biology. In Vitro 1974; 10:119-29.
- Ham, R.G., McKeegan, W.L.. Media and growth requirements. Methods Enzymol. 1979; 58:44-93.
- Han, J., Zang, Y., Lu, H., Zhu, J., Qin, J.. A novel recombinant dual human SCF expressed in and purified from silkworm, *Bombyx mori*, possesses higher bioactivity than recombinant monomeric human SCF. Eur. J. Haematol. 2004; 72(4):273-9.

Han, P., Hodge, G.. Intracellular cytokine production and cytokine receptor interaction of cord mononuclear cells: relevance to cord blood transplantation. Br. J. Haematol. 1999; 107(2):450-7.

Harrison, R.G.. Experiments in transplanting limbs and their bearings on the problems of the development of nerves. J. Exp. Zool. 1907; 4(2):239-81.

Henon, P.R.. Peripheral blood stem cell transplantations: past, present and future. Stem Cells 1993; 11(3):154-72.

Henschler, R., Mertelsmann, R.. Das pleiotrope Netzwerk der Zytokine. W.W. Williams, Hrsg., Georg Thieme Verlag, Stuttgart. Zytokine 1993; pp. 3-8

Herman, P., Ferrant, A., De Bruyere, M., Straetmans, N.. Stromal factors support the expansion of the whole hemopoietic spectrum from bone marrow CD34+DR- cells and of some hemopoietic subsets from CD34+ and CD34+DR+ cells. Leukemia 1998; 12(5):735-45.

Hermitte, F., Brunet de la Grange, P., Belloc, F., Praloran, V., Ivanovic, Z.. Very low O₂ concentration (0.1%) favors G₀ return of dividing CD34+ cells. Stem Cells 2006; 24(1):65-73.

Hevehan, D.L., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M.. Physiologically significant effects of pH and oxygen tension on granulopoiesis. Exp. Hematol. 2000; 28(3):267-75.

Hogge, D.E., Lansdorp, P.M., Reid, D., Gerhard, B., Eaves, C.J.. Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor. Blood 1996; 88(10):3765-73.

Holyoake, T.L., Alcorn, M.J., Richmond, L., Farrell, E., Pearson, C., Green, R., Dunlop, D.J., Fitzsimons, E., Pragnell, I.B., Franklin, I.M.. CD34 positive PBPC expanded ex vivo may not provide durable engraftment following myeloablative chemoradiotherapy regimens. Bone Marrow Transplant. 1997; 19(11):1095-101.

Hoshi, H., McKeenan, W.L.. Brain- and liver cell-derived factors are required for growth of human endothelial cells in serum-free culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1984; 81(20):6413-7.

Hua, J., Erickson, L.E., Yiin, T.Y., Glasgow, L.A.. A review of the effects of shear and interfacial phenomena on cell viability. Crit. Rev. Biotechnol. 1993; 13(4):305-28.

Iizuka, Y., Murphy, M.J.J.. Colony formation of granulocyte (CFU-g) and macrophage (CFU-m) precursors in serum- and albumin-free culture: effect of transferrin on clonal growth. Exp. Cell Biol. 1986; 54(5-6):275-80.

Inoue, N., Takeuchi, M., Ohashi, H., Suzuki, T.. The production of recombinant human erythropoietin. Biotechnol. Annu. Rev. 1995; 1:297-313.

Iscoe, N.N., Guilbert, L.J., Weyman, C.. Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acid, lecithin and cholesterol. Exp. Cell Res. 1980; 126(1):121-6.

Ivanovic, Z., Dello Sbarba, P., Trimoreau, F., Faucher, J.L., Praloran, V.. Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. Transfusion 2000; 40(12):1482-8.

Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fritsch, E.F.. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. Nature 1985; 313(6005):806-10.

Jacobsen, L.O., Marks, E.K., Robson, M.J., Gaston, E., Zirkle, R.E.. The effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. J. Lab. Clin. Med. 1949; 34:1538-1543.

Jäger, V., Lehmann, J., Friedl, P.. Serum-free growth medium for the cultivation of a wide spectrum of mammalian cells in stirred bioreactors. Cytotechnology 1988; 1(4):319-29.

Jaroscak, J., Goltry, K., Smith, A., Waters-Pick, B., Martin, P.L., Driscoll, T.A., Howrey, R., Chao, N., Douville, J., Burhop, S., Kurtzberg, J.. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the Aastrom Replicell System. Blood 2003; 101(12):5061-7.

Jazwiec, B., Solanilla, A., Grosset, C., Mahon, F.X., Dupouy, M., Pigeonnier Lagarde, V., Belloc, F., Schweitzer, K., Reiffers, J., Ripoche, J.. Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL-1 and glucocorticoids. Leukemia 1998; 12(8):1210-20.

Jelinek, N.. Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen – Kokultur im Festbettreaktor. Dissertation. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen, 2001.

Jenkins, N., Curling, E.M.. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. Enzyme Microb. Technol. 1994; 16(5):354-64.

Jordan, G.W.. Basis for the probit analysis of an interferon plaque reduction assay. J. Gen. Virol. 1972; 14(1):49-61.

Kallos, M.S., Behie, L.A.. Inoculation and growth conditions for high-cell-density expansion of mammalian neural stem cells in suspension bioreactors. Biotechnol. Bioeng. 1999; 63(4):473-83.

Kamel, A.M., El-Sharkawy, N., Mahmoud, H.K., Khalaf, M.R., El Haddad, A., Fahmy, O., El Fattah, R.A., Sayed, D.. Impact of CD34 subsets on engraftment kinetics in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2005; 35(2):129-36 .

Kanai, M., Hirayama, F., Yamaguchi, M., Ohkawara, J., Sato, N., Fukazawa, K., Yamashita, K., Kuwabara, M., Ikeda, H., Ikebuchi, K.. Stromal cell-dependent ex vivo expansion of human cord blood progenitors and augmentation of transplantable stem cell activity. Bone Marrow Transplant. 2000; 26(8):837-44.

Kato, K., Radbruch, A.. Isolation and characterization of CD34+ hematopoietic stem cells from human peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting. Cytometry 1993; 14(4):384-92.

Katoh, O., Tauchi, H., Kawaishi, K., Kimura, A., Satow, Y.. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. Cancer Res. 1995; 55(23):5687-92.

Kaufman, R.J., Sharp, P.A.. Construction of a modular dihydrofolate reductase cDNA gene: analysis of signals utilized for efficient expression. Mol. Cell Biol. 1982; 2(11):1304-19.

Kawada, H., Ando, K., Tsuji, T., Shimakura, Y., Nakamura, Y., Chargui, J., Hagihara, M., Itagaki, H., Shimizu, T., Inokuchi, S., Kato, S., Hotta, T.. Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. Exp. Hematol. 1999; 27(5):904-15.

Kawano, Y., Kobune, M., Chiba, H., Nakamura, K., Takimoto, R., Takada, K., Ito, Y., Kato, J., Hamada, H., Niitsu, Y.. Ex vivo expansion of G-CSF-mobilized peripheral blood CD133+ progenitor cells on coculture with human stromal cells. Exp. Hematol. 2006; 34(2):150-8.

Keeney, M., Brown, W., Gratama, J., Papa, S., Lanza, F., Sutherland, D.R.. Immunophenotypic characterization of CD34(pos) cells. J. Biol. Regul. Homeost. Agents 2003; 17(3):254.-60.

Keller, J.R., Ortiz, M., Ruscetti, F.W.. Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. Blood 1995; 86(5):1757-64.

Kim, B.S.. Production of human hematopoietic progenitors in a clinical-scale stirred suspension bioreactor. Biotechnol. Lett. 1998; 20:595-601.

Kim, D.K., Fujiki, Y., Fukushima, T., Ema, H., Shibuya, A., Nakauchi, H.. Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. Stem Cells 1999; 17(5):286-94.

Kinniburgh, D., Russell, N.H.. Comparative study of CD34-positive cells and subpopulations in human umbilical cord blood and bone marrow. Bone Marrow Transplant. 1993; 12(5):489-94.

Kittler, E.L., McGrath, H., Temeles, D., Crittenden, R.B., Kister, V.K., Quesenberry, P.J.. Biologic significance of constitutive and subliminal growth factor production by bone marrow stroma. Blood 1992; 79(12):3168-78.

Klein, G.. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. Experientia 1995; 51(9-10):914-26.

Kobari, L., Giarratana M.C., Poloni, A., Firat, H., Labopin, M., Gorin, N.C., Douay, L.. Flt 3 ligand, MGDF, Epo and G-CSF enhance ex vivo expansion of hematopoietic cell compartments in the presence of SCF, IL-3 and IL-6. Bone Marrow Transplant. 1998; 21(8):759-67.

Koeffler, H.P., Golde, D.W.. Human myeloid leukemia cell lines: a review. Blood 1980; 56(3):344-50.

Kogler, G., Callejas, J., Sorg, R.V., Wernet, P.. An eight-fold ex vivo expansion of long-term culture-initiating cells from umbilical cord blood in stirred suspension cultures. Bone Marrow Transplant. 1998a; 21(3):48-53

Kogler, G., Callejas, J., Sorg, R.V., Fischer, J., Migliaccio, A.R., Wernet, P.. The effect of different thawing methods, growth factor combinations and media on the ex vivo expansion of umbilical cord blood primitive and committed progenitors. Bone Marrow Transplant. 1998b; 21(3):233-41.

Kogler, G., Somville, T., Gobel, U., Hakenberg, P., Knipper, A., Fischer, J., Adams, O., Krempe, C., McKenzie, C., Ruttgers, H., Meier, W., Bellmann, O., Streng, H., Ring, A., Rosseck, U., Rocha, V., Wernet, P.. Haematopoietic transplant potential of unrelated and related cord blood: the first six years of the EUROCORD/NETCORD Bank Germany. Klein. Padiatr. 1999; 211(4):224-32.

Koller, M.R., Bender, J.G., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T.. Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. Exp. Hematol. 1992; 20(2):264-70.

Koller, M.R., Palsson, B.O.. Tissue Engineering: Reconstitution of human hematopoiesis ex vivo. Biotechnol. Bioeng. 1993; 42:909-30.

Koller, M.R., Palsson, M.A., Manchel, I., Palsson, B.O.. Long-term culture-initiating cell expansion is dependent on frequent medium exchange combined with stromal and other accessory cell effects. Blood 1995a; 86(5):1784-93.

Koller, M.R., Bradley, M.S., Palsson, B.O.. Growth factor consumption and production in perfusion cultures of human bone marrow correlate with specific cell production. Exp. Hematol. 1995b; 23(12):1275-83.

Koller, M.R., Manchel, I., Brott, D.A., Palsson, B.. Donor-to-donor variability in the expansion potential of human bone marrow cells is reduced by accessory cells but not by soluble growth factors. Exp. Hematol. 1996; 24(13):1484-93.

Koller, M.R., Manchel, I., Maher, R.J., Goltry, K.L., Armstrong, R.D., Smith, A.K.. Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system. Bone Marrow Transplant. 1998a; 21(7):653-63.

Koller, M.R., Maher, R.J., Manchel, I., Oxender, M., Smith, A.K.. Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media. J. Hematother. 1998b; 7(5):413-23.

Kratje, R.B., Lincoln, D.. Calculation of Cell Culture Parameters. Kalkulationsprogramm geschrieben in C, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, Deutschland. 1992.

Kubota, N., Orita, T., Hattori, K., Oh-eda, M., Ochi, N., Yamazaki, T.. Structural characterization of natural and recombinant human granulocyte colony-stimulating factors. J. Biochem. (Tokyo) 1990; 107(3):486-92.

Kuci, S., Wessels, J.T., Buhning, H.J., Schilbach, K., Schumm, M., Seitz, G., Löffler, J., Bader, P., Schlegel, P.G., Niethammer, D., Handgretinger, R.. Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. Blood 2003; 101(3):869-76.

Kusadasi, N., Koevoet, J.L., van Soest, P.L., Ploemacher, R.E.. Stromal support augments extended long-term ex vivo expansion of hemopoietic progenitor cells. Leukemia 2001; 15(9):1347-58.

Ladd, A.C., Pyatt, R., Gothot, A., Rice, S., McMahon, J., Traycoff, C.M., Srour, E.F.. Orderly process of sequential cytokine stimulation is required for activation and maximal proliferation of primitive human bone marrow CD34+ hematopoietic progenitor cells residing in G0. Blood 1997; 90(2):658-68.

Laemmli, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227(5259):680-5.

Laluppa, J.A., McAdams, T.A., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M.. Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. J. Biomed. Mater. Res. 1997; 36(3):347-59.

Lam, A.C., Li, K., Zhang, X.B., Li, C.K., Fok, T.F., Chang, A.M., James, A.E., Tsang, K.S., Yuen, P.M.. Preclinical ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice. Transfusion 2001; 41(12):1567-76.

Lansdorp, P.M., Dragowska, W.. Long-term erythropoiesis from constant numbers of CD34+ cells in serum-free cultures initiated with highly purified progenitor cells from human bone marrow. J. Exp. Med. 1992; 175(6):1501-9.

Larsen, B.R., West, F.G.. A method for quantitative amino acid analysis using precolumn o-phthaldialdehyde derivatization an high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. Sci. 1981; (19):259-65.

Leary, A.G., Ikebuchi, K., Hirai, Y., Wong, G.G., Yang, Y.C., Clark, S.C., Ogawa, M.. Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha. Blood 1988; 71(6):1759-63.

Lebkowski, J.S., Schain, L.R., Okarma, T.B.. Serum-free culture of hematopoietic stem cells: a review. Stem Cells 1995; 13(6):607-12.

Lefkovits, I., Waldmann, H.. Limiting dilution Analysis of Cells in the Immune System. Cambridge Univ. Press, London, 1975.

Lemoine, F.M., Humphries, R.K., Abraham, S.D., Krystal, G., Eaves, C.J.. Partial characterization of a novel stromal cell-derived pre-B-cell growth factor active on normal and immortalized pre-B cells. Exp. Hematol. 1988; 16(8):718-26.

Lemoli, R.M., Bertolini, F., Petrucci, M.T., Gregorj, C., Ricciardi, M.R., Fogli, M., Curti, A., Rabascio, C., Pandolfi, S., Ferrari, S., Foa, R., Baccarani, M., Tafuri, A.. Functional and kinetic characterization of granulocyte colony-stimulating factor-primed CD34- human stem cells. Br. J. Haematol. 2003; 123(4):720-9.

Leung, A.Y., Verfaillie, C.M.. All-trans retinoic acid (ATRA) enhances maintenance of primitive human hematopoietic progenitors and skews them towards myeloid differentiation in a stroma-noncontact culture system. Exp. Hematol. 2005; 33(4):422-7.

Levee, M., Lee, G.M., Paek, S-H., Palsson, B.O.. Microencapsulated Human Bone Marrow Cultures: A Potential Culture System for the Clonal Outgrowth of Hematopoietic Progenitor Cells. Biotechnol. Bioeng. 1994; (43):734-39.

Lewis, I.D., Verfaillie, C.M.. Multi-lineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. Exp. Hematol. 2000; 28(9):1087-95.

Li, K., Chuen, C.K., Lee, S.M., Law, P., Fok, T.F., Ng, P.C., Li, C.K., Wong, D., Merzouk, A., Salari, H., Gu, G.J., Yuen, P.M.. Small peptide analogue of SDF-1 α supports survival of cord blood CD34+ cells in synergy with other cytokines and enhances their ex vivo expansion and engraftment into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. Stem Cells 2006; 24(1):55-64.

Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z.. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1985; 82(22):7580-4.

Lin, H.S., Hsu, S.. Effects of dose rate and dose fractionation of irradiation on pulmonary alveolar macrophage colony-forming cells. Radiat. Res. 1985; 103(2):260-5.

Lindop, P.J., Rotblat, J.. Protection against acute effects of radiation by hypoxia. Nature 1960; 185:593-4.

Linenberger, M.L., Jacobson, F.W., Bennett, L.G., Broudy, V.C., Martin, F.H., Abkowitz, J.L.. Stem cell factor production by human marrow stromal fibroblasts. Exp. Hematol. 1995; 23(10):1104-14.

Linz, M., Zeng, A.P., Wagner, R., Deckwer, W.D.. Stoichiometry, kinetics, and regulation of glucose and amino acid metabolism of a recombinant BHK cell line in batch and continuous cultures. Biotechnol. Prog. 1997; 13(4):453-63.

Lisovsky, M., Braun, S.E., Ge, Y., Takahira, H., Lu, L., Savchenko, V.G., Lyman, S.D., Broxmeyer, H.E.. Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. Leukemia 1996; 10(6):1012-8.

Liu, Y., Pei, X., Lu, S.. Studies on hematopoietic reconstitution by ex vivo expanded human cord blood hematopoietic stem/progenitor cells in SCID mice. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 1999; 20(12):634-6.

Loeuillet, C., Bernard, G., Remy-Martin, J., Saas, P., Herve, P., Douay, L., Chalmers, D.. Distinct hematopoietic support by two human stromal cell lines. Exp Hematol. 2001; 29(6):736-45.

Lundell, B.I., Vredenburgh, J.J., Tyer, C., DeSombre, K., Smith, A.K.. Ex vivo expansion of bone marrow from breast cancer patients: reduction in tumor cell content through passive purging. Bone Marrow Transplant. 1998; 22(2):153-9.

Lutton, J.D., Zanjani, E.D., Kopac, M.J., Gordon, A.S.. Cartesian diver studies on respiration of rat bone marrow cells in the presence of erythropoietin and anti-erythropoietin. Experientia 1972; 28(7):850.

Madlambayan, G.J., Rogers, I., Kirouac, D.C., Yamanaka, N., Mazurier, F., Doedens, M., Casper, R.F., Dick, J.E., Zandstra, P.W.. Dynamic changes in cellular and microenvironmental composition can be controlled to elicit in vitro human hematopoietic stem cell expansion. Exp. Hematol. 2005; 33(10):1229-39.

Maiese, K., Li, F., Chong, Z.Z.. New avenues of exploration for erythropoietin. JAMA 2005; 293(1):90-5.

Martin, F.H., Suggs, S.V., Langley, K.E., Lu, H.S., Ting, J., Okino, K.H., Morris, C.F., McNiece, I.K., Jacobsen, F.W., Mendiaz, E.A.. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. Cell 1990; 63(1):203-11.

Mathé, G.. The treatment of acute leukemia. Current methods and orientation of research. Maroc Med. 1963; (42):83-91.

Matsumoto, K., Nakano, T.. In vitro Proliferation Potential of AC133 Positive Cells in Peripheral Blood. Stem Cells 2000; (18):196-203.

Mayani, H., Dragowska, W., Lansdorp, P.M.. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. Blood 1993; 82(9):2664-72.

Mayani, H., Little, M.T., Dragowska, W., Thornbury, G., Lansdorp, P.M.. Differential effects of the hematopoietic inhibitors MIP-1 alpha, TGF-beta, and TNF-alpha on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34+ cells purified from cord blood and fetal liver. Exp. Hematol. 1995; 23(5):422-7.

Maximov, A.. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. Folia Haematol. 1909; 8:125-34.

McAdams, T.A., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T.. Hematopoietic cell culture therapies (Part I): Cell culture considerations. Trends Biotechnol. 1996a; 14(9):341-9.

McAdams, T.A., Winter, J.N., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T.. Hematopoietic cell culture therapies (Part II): Clinical aspects and applications. Trends Biotechnol. 1996b; 14(10):388-96.

McAdams, T.A., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T.. Variations in culture pH affect the cloning efficiency and differentiation of progenitor cells in ex vivo haemopoiesis. Br. J. Haematol. 1997; 97(4):889-95.

McAdams, T.A., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T.. pH is a potent modulator of erythroid differentiation. Br. J. Haematol. 1998; 103(2):317-25.

McAlister, I.B., Teepe, M., Gillis, S., Williams, D.E.. Ex vivo expansion of peripheral blood progenitor cells with recombinant cytokines. Exp. Hematol. 1992; 20(5):626-8.

McCune, J.M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L.D., Lieberman, M., Weissman, I.L.. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. Science 1988; 241(4873):1632-9.

McDowell, C.L., Papoutsakis, E.T.. Increased agitation intensity increases CD13 receptor surface content and mRNA levels, and alters the metabolism of HL60 cells cultured in stirred tank bioreactors. Biotechnol. Bioeng. 1998a; 60(2):239-50.

McDowell, C.L., Papoutsakis, E.T.. Serum increases the CD13 receptor expression, reduces the transduction of fluid-mechanical forces, and alters the metabolism of HL60 cells cultured in agitated bioreactors. Biotechnol. Bioeng. 1998b; 60(2):259-68.

McKenna, H.J., de Vries, P., Brasel, K., Lyman, S.D., Williams, D.E.. Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. Blood 1995; 86(9):3413-20.

McNiece, I.K., Robinson, B.E., Quesenberry, P.J.. Stimulation of murine colony-forming cells with high proliferative potential by the combination of GM-CSF and CSF-1. Blood 1988; 72(1):191-5.

McNiece, I.K., Stewart, F.M., Deacon, D.M., Temeles, D.S., Zsebo, K.M., Clark, S.C., Quesenberry, P.J.. Detection of a human CFC with a high proliferative potential. Blood 1989; 74(2):609-12.

McNiece, I., Jones, R., Bearman, S.I., Cagnoni, P., Nieto, Y., Franklin, W., Ryder, J., Steele, A., Stoltz, J., Russell, P., McDermitt, J., Hogan, C., Murphy, J., Shpall, E.J.. Ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells provide rapid neutrophil recovery after high-dose chemotherapy in patients with breast cancer. Blood 2000a; 96(9):3001-7.

McNiece, I., Kubegov, D., Kerzic, P., Shpall, E.J., Gross, S.. Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. Exp Hematol. 2000b; 28(10):1181-6.

Melamed, M.R.. Flow cytometry detection and evaluation of bladder tumors. J. Occup. Med. 1990; 32(9):829-33.

Mercille, S., Johnson, M., Lanthier, S., Kamen, A.A., Massie, B.. Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates. Biotechnol. Bioeng. 2000; 67(4):435-50.

Mersmann, A., Einenkel, W.D., Käppel, M.. Auslegung und Maßstabsvergrößerung von Rührapparaten. Chemie-Ingenieur-Technik 1975; 47(23): 953-964.

Merten, O.W.. Safety issues of animal products used in serum-free media. Dev. Biol. Stand. 1999; 99:167-80.

Messner, H.A., Fauser, A.A., Lepine, J., Martin, M.. Properties of human pluripotent hematopoietic progenitors. Blood Cells 1980; 6:595-607.

Migliaccio, A.R., Migliaccio, G., Adamson, J.W.. Effect of recombinant hematopoietic growth factors on proliferation of human marrow progenitor cells in serum-deprived liquid culture. Blood 1988; 72(4):1387-92.

Migliaccio, A.R., Adamson, J.W., Stevens, C.E., Dobrila, N.L., Carrier, C.M., Rubinstein, P.. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. Blood 2000; 96(8):2717-22.

Miller, J.S., Verfaillie, C., McGlave, P.. The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture. Blood 1992; 80(9):2182-7.

Miller, J.S., McCullar, V., Verfaillie, C.M.. Ex vivo culture of CD34+/Lin-/DR- cells in stroma-derived soluble factors, interleukin-3, and macrophage inflammatory protein-1alpha maintains not only myeloid but also lymphoid progenitors in a novel switch culture assay. Blood 1998; 91(12):4516-22.

Miller, W.M., Wilke, C.R., Blanch, H.W.. Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. J. Cell. Physiol. 1987; 132(3):524-30.

Mills, K.C., Gross, T.G., Varney, M.L., Heimann, D.G., Reed, E.C., Kessinger, A., Talmadge, J.E.. Immunologic phenotype and function in human bone marrow, blood stem cells and umbilical cord blood. Bone Marrow Transplant. 1996; 18(1):53-61.

Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A.. High gradient magnetic cell separation with MACS. Cytometry 1990; 11(2):231-8.

Mohle, R., Bautz, F., Rafii, S., Moore, M.A., Brugger, W., Kanz, L.. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. Blood 1998; 91(12):4523-30.

Moonen, P., Mermod, J.J., Ernst, J.F., Hirschi, M., DeLamarter, J.F.. Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987; 84(13):4428-31.

Moore, M.A., Dorn, D.C., Schuringa, J.J., Chung, K.Y., Morrone, G.. Constitutive activation of Flt3 and STAT5A enhances self-renewal and alters differentiation of hematopoietic stem cells. Exp. Hematol. 2007; 35(4 Suppl 1):105-16.

Mostafa, S.S., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T.. Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. Br. J. Haematol. 2000; 111(3):879-89.

Muench, M.O., Gasparetto, C., Moore, M.A.. The in vitro growth of murine high proliferative potential-colony forming cells is not enhanced by growth in a low oxygen atmosphere. Cytokine 1992; 4(6):488-94.

Müller-Sieburg, C.E., Cho, R.H., Thoman, M., Adkins, B., Sieburg, H.B.. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Blood 2002; 100(4):1302-9.

Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziyo, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H.. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. Nature 1986; 319(6052):415-8.

Naiyer, A.J., Jo, D.Y., Ahn, J., Mohle, R., Peichev, M., Lam, G., Silverstein, R.L., Moore, M.A., Rafii, S.. Stromal derived factor-1-induced chemokinesis of cord blood CD34(+) cells (long-term culture-initiating cells) through endothelial cells is mediated by E-selectin. Blood 1999; 94(12):4011-9.

Naparstek, E., Hardan, Y., Ben-Shahar, M., Nagler, A., Or, R., Mumcuoglu, M., Weiss, L., Samuel, S., Slavin, S.. Enhanced marrow recovery by short preincubation of marrow allografts with human recombinant interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 1992; 80(7):1673-8.

Nardi, N.B., Alfonso, Z.Z.C.. The hematopoietic stroma. Braz. J. Med. Biol. Res. 1999; 32:601-9.

Neumann, E.. Über die Bedeutung des Knochenmarks für die Blutbildung. Vorläufige Mitteilung. Centralblatt für die Medizinische Wissenschaften 1868; 44:122 Titelblatt

Neumann, E.. Über die Bedeutung des Knochenmarks für die Blutbildung. Vorläufige Mitteilung. Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Blutkörperchen. Wagners Archiv der Heilkunde 1869; 10:68-102

Nielsen, L.K.. Bioreactors for hematopoietic cell culture. Annu. Rev. Biomed. Eng. 1999; 1:129-52.

Noll, T., Jelinek, N., Schmid, S., Biselli, M., Wandrey, C.. Cultivation of hematopoietic stem and progenitor cells: biochemical engineering aspects. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2002; 74:111-19.

Nolta, J.A., Dao, M.A., Wells, S., Smogorzewska, E.M., Kohn, D.B.. Transduction of pluripotent human hematopoietic stem cells demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996; 93(6):2414-9.

Ostendorf, P.C.. Hämatologie. Innere Medizin der Gegenwart. Urban und Schwarzenberg – München, Wien Baltimore. 1991.

Owens, M.A., Loken, M.R.. Flow Cytometry: Principles for Clinical Laboratory Practice. Wiley-Liss, New York, 1995.

Palomares, L.A., Gonzalez, M., Ramirez, O.T.. Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production. Enzyme Microb. Technol. 2000; 26(5-6):324-31.

Palsson, B.O., Paek, S.H., Schwartz, R.M., Palsson, M., Lee, G.M., Silver, S., Emerson, S.G.. Expansion of human bone marrow progenitor cells in a high cell density continuous perfusion system. Biotechnology (N.Y.) 1993; 11(3):368-72.

Pappenheim, A.. Abstammung und Entstehung der der rothen Blutzellen. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinischer Medizin 1898; 151(XV):89-158.

Paquette, R.L., Gonzales, E., Yoshimura, R., Tran, L., Choi, R., Baldwin, G., Slamon, D. J., Glaspy, J.. Ex vivo expansion and differentiation of unselected peripheral blood progenitor cells in serum-free media. J. Hematother. 1998; 7(6):481-91.

Paquette, R.L., Dergham, S.T., Karpf, E., Wang, H.J., Slamon, D.J., Souza, L., Glaspy, J.A.. Culture conditions affect the ability of ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells to accelerate hematopoietic recovery. Exp. Hematol. 2002; 30(4):374-80.

Paquette, R.L., Dergham, S.T., Karpf, E., Wang, H.J., Slamon, D.J., Souza, L., Glaspy, J.A.. Ex vivo expanded unselected peripheral blood: progenitor cells reduce posttransplantation neutropenia, thrombocytopenia, and anemia in patients with breast cancer. Blood 2000; 96(7):2385-90.

Patel, S.D., Papoutsakis, E.T., Winter, J.N., Miller, W.M.. The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures. Biotechnol. Prog. 2000; 16(5):885-92.

Paul, S.R., Yang, Y.C., Donahue, R.E., Goldring, S., Williams, D.A.. Stromal cell-associated hematopoiesis: immortalization and characterization of a primate bone marrow-derived stromal cell line. Blood 1991; 77(8):1723-33.

Peault, B.. Analysis of human blood cell development in the SCID-hu mouse, an in vivo replica of the human fetal hematopoietic system. C. R. Acad. Sci. III. 1993; 316(9):902-8.

Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A., Rafii, S.. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. Blood 2000; 95(3):952-8.

Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., Slav, M.M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R., Zipori, D., Lapidot, T.. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. Blood 2000; 95(11):3289-96.

Peng, C.A., Palsson, B.O.. Determination of specific oxygen uptake rates in human hematopoietic cultures and implications for bioreactor design. Ann. Biomed. Eng. 1996; 24(3):373-81.

Pierson, B.A., Europa, A.F., Hu, W.S., Miller, J.S.. Production of human natural killer cells for adoptive immunotherapy using a computer-controlled stirred-tank bioreactor. J. Hematother. 1996; 5(5):475-83.

Ploemacher, R.E., van der Sluijs, J.P., Voerman, J.S., Brons, N.H.. An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. Blood 1989; 74(8):2755-63.

Ploemacher, R.E., van der Sluijs, J.P., van der Beurden, C.A., Baert, M.R., Chan, P.L.. Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse. Blood 1991; 78(10):2527-33.

Ploemacher, R.E.. Stem cells: characterization and measurement. Baillieres Clin. Hematol. 1997; 10(3):429-44.

Podesta, M., Piaggio, G., Pitto, A., Zocchi, E., Soracco, M., Frassoni, F., Luchetti, S., Painelli, E., Bacigalupo, A.. Modified in vitro conditions for cord blood-derived long-term culture-initiating cells. Exp. Hematol. 2001; 29(3):309-14.

Quentmeier, H., Zaborski, M., Drexler, H.G.. The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines. Leuk. Res. 1997; 21(4):343-50.

Querol, S., Cancelas, J.A., Amat, L., Capmany, G., Garcia, J.. Effect of glycosylation of recombinant human granulocytic colony-stimulating factor on expansion cultures of umbilical cord blood CD34+ cells. Haematologica 1999; 84(6):493-8.

Rafii, S., Shapiro, F., Pettengell, R., Ferris, B., Nachman, R.L., Moore, M.A., Asch, A.S.. Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. Blood 1995; 86(9):3353-63.

Ramirez, M., Rottman, G.A., Shultz, L.D., Civin, C.I.. Mature human hematopoietic cells in donor bone marrow complicate interpretation of stem/progenitor cell assays in xenogeneic hematopoietic chimeras. Exp. Hematol. 1998; 26(4):332-44.

Rao, S.G., Chitnis, V.S., Deora, A., Tanavde, V., Desai, S.S.. An ICAM-1 like cell adhesion molecule is responsible for CD34 positive haemopoietic stem cells adhesion to bone-marrow stroma. Cell Biol. Int. 1996; 20(4):255-9.

Rappold, I., Ziegler, B.L., Kohler, I., Marchetto, S., Rosnet, O., Birnbaum, D., Simmons, P.J., Zannettino, A.C., Hill, B., Neu, S., Knapp, W., Alitalo, R., Alitalo, K., Ullrich, A., Kanz, L., Buhring, H.J.. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. Blood 1997; 90(1):111-25

Raynal, P., Pollard, H.B.. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. Biochim. Biophys. Acta 1994; 1197(1):63-93.

Reiffers, J., Cailliot, C., Dazey, B., Attal, M., Caraux, J., Boiron, J.M.. Abrogation of post-myeloablative chemotherapy neutropenia by ex-vivo expanded autologous CD34-positive cells. Lancet 1999; 354(9184):1092-3.

Reis, M.D.. Enumeration of CD34+ hematopoietic precursor cells: current status. Transplant. Proc. 1999; 31(7):2970-2.

Reykdal, S., Abboud, C., Liesveld, J.. Effect of nitric oxide production and oxygen tension on progenitor preservation in ex vivo culture. Exp. Hematol. 1999; 27(3):441-50.

Reznikoff, C.A., Bertram, J.S., Brankow, D.W., Heidelberger, C.. Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. Cancer Res. 1973; 33(12):3239-49.

Richman, C.M., Weiner, R.S., Yankee, R.A.. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. Blood 1976; 47(6):1031-9.

Rosler, E., Brandt, J., Chute, J., Hoffman, R.. Cocultivation of umbilical cord blood cells with endothelial cells leads to extensive amplification of competent CD34+CD38- cells. Exp. Hematol. 2000; 28(7):841-52.

Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A., Kurtzberg, J., Adamson, J., Migliaccio, A.R., Berkowitz, R.L., Cabbad, M., Dobrila, N.L., Taylor, P.E., Rosenfield, R.E., Stevens, C.E.. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. N. Engl. J. Med. 1998; 339(22):1565-77.

Ryll, T.. Vergleich zur Kultivierung der Zelllinie BHK 21 pSVIL2 im Hohlfasermodule und Rührreaktor am Beispiel der Produktion rekombinanten Interleukin 2. Diplomarbeit. TU Braunschweig, 1989.

Sandstrom, C.E., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T.. Review: Serum-free Media for cultures of primitive and mature hematopoietic cells. Biotechnol. Bioeng. 1994; 43:706-733.

Sandstrom, C.E., Bender, J.G., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M.. Effects of CD34+ cell selection and perfusion on ex vivo expansion of peripheral blood mononuclear cells. Blood 1995; 86(3):958-70.

Sandstrom, C.E., Collins, P.C., McAdams, T.A., Bender, J.G., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M.. Comparison of whole serum-deprived media for ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells from cord blood and mobilized peripheral blood mononuclear cells. J. Hematother. 1996; 5(5):461-73.

Sardonini, C.A., Wu, Y.J.. Expansion and differentiation of human hematopoietic cells from static cultures through small-scale bioreactors. Biotechnol. Prog. 1993; 9(2):131-7.

Schattner, M., Green, D., Cohen, I.. Stromal-conditioned medium synergizes with thrombopoietin in stimulating megakaryocytopoiesis. Stem Cells 1998; 16(1):61-5.

Schiller, G., Vescio, R., Freytes, C., Spitzer, G., Sahebi, F., Lee, M., Wu, C.H., Cao, J., Lee, J.C., Hong, C.H.. Transplantation of CD34+ peripheral blood progenitor cells after high-dose chemotherapy for patients with advanced multiple myeloma. Blood 1995; 86(1):390-7.

Schmidt, S.. Verfahrenstechnik für die Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen. Dissertation. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen, 2000.

Schroeder, M., Niebruegge, S., Werner, A., Willbold, E., Burg, M., Ruediger, M., Field, L.J., Lehmann, J., Zweigerdt, R.. Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control. Biotechnol. Bioeng. 2005; 92(7):920-33.

Schügerl, K.. Reaktionstechnische Grundlagen zur Auslegung und zum Betrieb von Bioreaktoren, Teil 1. Chemieingenieurtechnik 1983; 56(2):123-134.

Schumpe, A., Quicker, G., Deckwer, W.D.. Gas Solubilities in Microbial Culture Media. In: Adv. Biochem. Eng., 1982, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, 24:1-38.

Schwartz, R.M., Caldwell, J., Clarke, M.F., Emerson, S.G., Palsson, B.O.. The influence of extra-cellular matrix and stroma remodelling on the productivity of long-term human bone marrow cultures. Cytotechnology 1992; 10(3):217-24.

Scott, M.A., Apperley, J.F., Bloxham, D.M., Jestice, H.K., John, S., Marcus, R.E., Gordon, M.Y.. Biological properties of peripheral blood progenitor cells mobilized by cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor. Br. J. Haematol. 1997; 97(2):474-80.

Sensebe, L., Li, J., Lilly, M., Crittenden, C., Herve, P., Charbord, P., Singer, J.W.. Nontransformed colony-derived stromal cell lines from normal human marrows. I. Growth requirement and myelopoiesis supportive ability. Exp. Hematol. 1995; 23(6):507-13.

Servida, F., Soligo, D., Caneva, L., Bertolini, F., de Harven, E., Campiglio, S., Corsini, C., Deliliers, G.L.. Functional and morphological characterization of immunomagnetically selected CD34+ hematopoietic progenitor cells. Stem Cells 1996; 14(4):430-8.

Shapiro, H.M.. Cell membrane potential analysis. Methods Cell Biol. 1994; (41):121-33

Shankey, T.V., Rabinovitch, P.S., Bagwell, B., Bauer, K.D., Duque, R.E., Hedley, D.W., Mayall, B.H., Wheelless, L., Cox, C.. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. International Society for Analytical Cytology. Cytometry 1993; 14(5):472-77.

Shih, C.C., Hu, M.C., Hu, J., Weng, Y., Yazaki, P.J., Medeiros, J., Forman, S.J.. A secreted and LIF-mediated stromal cell-derived activity that promotes ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. Blood 2000; 95(6):1957-66.

Shimakura, Y., Kawada, H., Ando, K., Sato, T., Nakamura, Y., Tsuji, T., Kato, S., Hotta, T.. Murine stromal cell line HESS-5 maintains reconstituting ability of Ex vivo-generated hematopoietic stem cells from human bone marrow and cytokine-mobilized peripheral blood. Stem Cells 2000; 18(3):183-9.

Shimizu, Y., Ogawa, M., Kobayashi, M., Almeida-Porada, G., Zanjani, E.D.. Engraftment of cultured human hematopoietic cells in sheep. Blood 1998; 91(10):3688-92.

Siena, S., Castro Malaspina, H., Gulati, S.C., Lu, L., Colvin, M.O., Clarkson, B.D., O'Reilly, R.J., Moore, M.A.. Effects of in vitro purging with 4-hydroperoxycyclophosphamide on the hematopoietic and microenvironmental elements of human bone marrow. Blood 1985; 65(3):655-62.

Smith, G.E., Ju, G., Ericson, B.L., Moschera, J., Lahm, H.W., Chizzonite, R., Summers, M.D.. Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1985; 82(24):8404-8.

Smith, S.L., Bender, J.G., Maples, P.B., Unverzagt, K., Schilling, M., Lum, L., Williams, S., Van Epps, D.E.. Expansion of neutrophil precursors and progenitors in suspension cultures of CD34+ cells enriched from human bone marrow. Exp. Hematol. 1993; 21(7):870-7.

Socinski, M.A., Cannistra, S.A., Elias, A., Antman, K.H., Schnipper, L., Griffin, J.D.. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. Lancet 1988; 1(8596):1194-8.

Soligo, D., Lambertenghi Deliliers, G., Quirici, N., Servida, F., Caneva, L., Lamorte, G.. Expansion of dendritic cells derived from human CD34+ cells in static and continuous perfusion cultures. Br. J. Haematol. 1998; 101(2):352-63.

Spurr, E.E., Wiggins, N.E., Marsden, K.A., Lowenthal, R.M., Ragg, S.J.. Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5-14 years) cryostorage. Cryobiology 2002; 44(3):210-7.

Stiff, P., Chen, B., Franklin, W., Oldenberg, D., I, E., Bayer, R., Shpall, E., Douville, J., Mandalam, R., Malhotra, D., Muller, T., Armstrong, R.D., Smith, A.. Autologous transplantation of ex vivo expanded bone marrow cells grown from small aliquots after high-dose chemotherapy for breast cancer. Blood 2000; 95(6):2169-74.

Storb, R.. Marrow transplantation. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1992; 177:169-86.

Storhas, W.. Bioreaktoren und periphere Einrichtungen. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig/Wiesbaden, 1994.

Stute, N., Holtz, K., Bubenheim, M., Lange, C., Blake, F., Zander, A.R.. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. Exp. Hematol. 2004; 32(12):1212-25.

Sutherland, D.R., Anderson, L., Keeney, M., Nayar, R., Chin-Yee, I.. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J. Hematother. 1996; 5(3):213-26.

Sutherland, H.J., Eaves, C.J., Eaves, A.C., Dragowska, W., Lansdorp, P.M.. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. Blood 1989; 74(5):1563-70.

Suzuki, T., Yokoyama, Y., Kumano, K., Takanashi, M., Kozuma, S., Takato, T., Nakahata, T., Nishikawa, M., Sakano, S., Kurokawa, M., Ogawa, S., Chiba, S.. Highly efficient ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein. Stem Cells 2006; 24(11):2456-65.

Szefer, S.J., Norton, C.E., Ball, B., Gross, J.M., Aida, Y., Pabst, M.J.. IFN-gamma and LPS overcome glucocorticoid inhibition of priming for superoxide release in human monocytes. Evidence that secretion of IL-1 and tumor necrosis factor-alpha is not essential for monocyte priming. J. Immunol. 1989; 142(11):3985-92.

Taichman, R.S., Reilly, M.J., Emerson, S.G.. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. Blood 1996; 87(2):518-24.

Takahira, H., Lyman, S.D., Broxmeyer, H.E.. Flt3 ligand prolongs survival of CD34+ human umbilical cord blood myeloid progenitors in serum-depleted culture medium. Ann. Hematol. 1996; 72(3):131-5.

Takeuchi, M., Takasaki, S., Shimada, M., Kobata, A.. Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem. 1990; 265(21):12127-30.

Takeyama, K., Ohto, H.. PBSC mobilization. Transfus. Apher. Sci. 2004; 31(3):233-43.

Tanaka, H., Matsumura, I., Itoh, K., Hatsuyama, A., Shikamura, M., Satoh, Y., Heike, T., Nakahata, T., Kanakura, Y.. HOX decoy peptide enhances the ex vivo expansion of human umbilical cord blood CD34+ hematopoietic stem cells/hematopoietic progenitor cells. Stem Cells 2006; 24(11):2592-602.

Thalmeier, K., Meissner, P., Reisbach, G., Falk, M., Brechtel, A., Dormer, P.. Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. Blood 1994; 83(7):1799-807.

Taswell, C.. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. J. Immunol. 1981; 126(4):1614-9.

Teixido, J., Hemler, M.E., Greenberger, J.S., Anklesaria, P.. Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. J. Clin. Invest. 1992; 90(2):358-67.

Testa, N.G., Molineux, G.. Clonal and long-term cultures using human bone marrow. In: Haemopoiesis: A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, 1993.

Theunissen, K., Verfaillie, C.M.. A multifactorial analysis of umbilical cord blood, adult bone marrow and mobilized peripheral blood progenitors using the improved ML-IC assay. Exp. Hematol. 2005; 33(2):165-72.

Thomas, E.D., Storb, R., Fefer, A., Slichter, S.J., Bryant, J.I., Buckner, C.D., Neiman, P.E., Clift, R.A., Funk, D.D., Lerner, K.E.. Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. Lancet 1972; 1(7745):284-9.

To, L.B., Haylock, D.N., Simmons, P.J., Juttner, C.A.. The biology and clinical uses of blood stem cells. Blood 1997; 89(7):2233-58.

Toksoz, D., Zsebo, K.M., Smith, K.A., Hu, S., Brankow, D., Suggs, S.V., Martin, F.H., Williams, D.A.. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992; 89(16):7350-4.

Urlaub, G., Chasin, L.A.. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1980; 77(7):4216-20.

Van den Oudenrijn, S., von dem Borne, A.E., de Haas, M.. Influence of medium components on ex vivo megakaryocyte expansion. J. Hematother. Stem Cell Res. 2001; 10(1):193-200.

Van der Loo, J.C., Xiao, X., McMillin, D., Hashino, K., Kato, I., Williams, D.A.. VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. J. Clin. Invest. 1998; 102(5):1051-61.

Van Bekkum, D.W., Vos, O.. Immunological aspects of homo- and heterologous bone marrow transplantation in irradiated animals. J. Cell. Physiol. 1957; 50(1):139-56.

Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., McCawley, P.. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). In Vitro 1977; 13(4):213-7.

Verfaillie, C.M., Blakolmer, K., McGlave, P.. Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. J. Exp. Med. 1990; 172(2):509-2.

Verfaillie, C.M.. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis. Blood 1992; 79(11):2821-6.

Verfaillie, C.M.. Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. Blood 1993; 82(7):2045-53.

Verfaillie, C.M., Catanzarro, P.M., Li, W.N.. Macrophage inflammatory protein 1 alpha, interleukin 3 and diffusible marrow stromal factors maintain human hematopoietic stem cells for at least eight weeks in vitro. J. Exp. Med. 1994; 179(2):643-9.

Verfaillie, C.M., Catanzaro, P.. Direct contact with stroma inhibits proliferation of human long-term culture initiating cells. Leukemia 1996; 10(3):498-504.

Verlinden, S.F., Mulder, A.H., de Leeuw, J.P., van Bekkum, D.W.. T lymphocytes determine the development of xeno GVHD and of human hemopoiesis in NOD/SCID mice following human umbilical cord blood transplantation. Stem Cells 1998; 16(1):205-17.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C.. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J. Immunol. Methods 1995; 184(1):39-51.

Verstegen, M.M., van Hennik, P.B., Terpstra, W., van den Bos, Wielenga, J.J., van den Rooijen, N., Ploemacher, R.E., Wagemaker, G., Wognum, A.W.. Transplantation of human umbilical cord blood cells in macrophage-depleted SCID mice: evidence for accessory cell involvement in expansion of immature CD34+CD38- cells. Blood 1998; 91(6):1966-76.

Volk, O., Neumann, G.. Verhalten ausgewählter Aminosäuren während eines Dreifachlangtriathlons. Dtsch. Z. Sportmed. 2001; 52:169-74.

Von Drygalski, A., Adamson, J.W.. Placental/umbilical cord blood (PCB) stem cells for transplantation: early clinical outcomes and the status of ex vivo expansion strategies. Keio J. Med. 2000; 49(4):141-51.

Von Keyserlingk, D. G.: Anatomie des Knochenmarks. In: W. Queißer, Hrsg., Das Knochenmark: Morphologie, Funktion, Diagnostik. Stuttgart, Thieme Verlag 1978: pp. 78-98

Vorlop, J.. Entwicklung eines Membranrührers zur blasenfreien Begasung und Durchmischung von Zellkulturreaktoren im Piltomaßstab. Dissertation. TU Braunschweig, 1990.

Waldmann, H., Lefkovits, I., Quintans, J.. Limiting dilution analysis of helper T-cell function. Immunology 1975; 28(6):1135-48.

Walford, R.L., Gallagher, R., Sjaarda, J.R.. Serologic typing of human lymphocytes with immune serum obtained after homografting. Science 1964; 144:868-70.

Wang, J.C., Doedens, M., Dick, J.E.. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. Blood 1997; 89(11):3919-24.

Wang, S.Y., Hsu, M.L., Huang, M.Z., Hsu, H.C., Tzeng, C.H., Hung, J.H., Ho, C.K.. The activity in ex vivo expansion of cord blood myeloid progenitor cells before and after cryopreservation. Acta Haematol. 2001; 105(1):38-44.

Wang, Y., Willott, E., Kanost, M.R.. Organization and expression of the hemolin gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta*. Insect Mol. Biol. 1995; 4(2):113-23.

Whetton, A.D., Spooncer, E.. Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. Curr. Opin. Cell Biol. 1998; 10(6):721-6.

Whitlock, C.A., Witte, O.N.. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1982; 79(11):3608-12.

Williams, D.E., Straneva, J.E., Shen, R.N., Broxmeyer, H.E.. Purification of murine bone-marrow-derived granulocyte-macrophage colony-forming cells. Exp. Hematol. 1987; 15(3):243-50.

Williams, S.F., Lee, W.J., Bender, J.G., Zimmerman, T., Swinney, P., Blake, M., Carreon, J., Schilling, M., Smith, S., Williams, D.E., et al.. Selection and expansion of peripheral blood CD34+ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. Blood 1996; 87(5):1687-91.

Wollert, K.C., Meyer, G.P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A., Drexler, H.. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. Lancet 2004; 364(9429):141-8.

Xiao, M., Broxmeyer, H.E., Horie, M., Grigsby, S., Lu, L.. Extensive proliferative capacity of single isolated CD34 human cord blood cells in suspension culture. Blood Cells 1994; 20(2-3):455-66.

Yamaguchi, M., Hirayama, F., Kanai, M., Sato, N., Fukazawa, K., Yamashita, K., Sawada, K., Koike, T., Kuwabara, M., Ikeda, H., Ikebuchi, K.. Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. Exp. Hematol. 2001; 29(2):174-82.

Yang, M., Li, K., Ng, P.C., Chuen, C.K., Lau, T.K., Cheng, Y.S., Liu, Y.S., Li, C.K., Yuen, P.M., James, A.E., Lee, S.M., Fok, T.F.. Promoting effects of serotonin on hematopoiesis: ex vivo expansion of cord blood CD34+ stem/progenitor cells, proliferation of bone marrow stromal cells, and antiapoptosis. Stem Cells 2007; 25(7):1800-6.

Yang, Y.C., Clark, S.C.. Structure of the gene for human interleukin-3 or multi-CSF. Prog. Clin. Biol. Res. 1987; 251:3-11.

Yao, C.L., Chu, I.M., Hsieh, T.B., Hwang, S.M.. A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. Exp. Hematol. 2004; 32(8):720-7.

Yeoh, J.S., van Os, R., Weersing, E., Ausema, A., Dontje, B., Vellenga, E., de Haan, G.. Fibroblast growth factor-1 and -2 preserve long-term repopulating ability of hematopoietic stem cells in serum-free cultures. Stem Cells 2006; 24(6):1564-72.

Yildirim, S., Boehmler, A.M., Kanz, L., Mohle, R.. Expansion of cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells in coculture with autologous umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is superior to cytokine-supplemented liquid culture. Bone Marrow Transplant. 2005; 36(1):71-9.

Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., Buck, D.W.. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 1997; 90(12):5002-12.

Yong, K.L., Watts, M., Shaun, T.N., Sullivan, A., Ings, S., Linch, D.C.. Transmigration of CD34+ cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1 (CD31). Blood 1998; 91(4):1196-205.

Zandstra, P. W., Eaves, C. J., Piret, J. M.. Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactors of normal human bone marrow cells. Biotechnology (N.Y.) 1994; 12(9):909-14

Zandstra, P.W., Conneally, E., Petzer, A.L., Piret, J.M., Eaves, C.J.. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997; 94(9):4698-703.

Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ascensao, J.L., MacKintosh, F.R., Flake, A.W.. Transplantation of hematopoietic stem cells in utero. Stem Cells 1997; 15(1):79-92.

Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Livingston, A.G., Flake, A.W., Ogawa, M.. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. Exp. Hematol. 1998; 26(4):353-60.

Zech, N.H., Gunsilius, E., Clausen, J., Hoflehner, E., Hoelzler, K., Gastl, G., Petzer, A.L.. Expansion of mobilized peripheral blood progenitor cells under defined culture conditions using CD34+CD71-CD45- cells as a starting population. J. Hematother. Stem Cell Res. 2003; 12(4):367-73.

Zhang, Z., Chisti, Y., Moo-Young, M.. Effects of the hydrodynamic environment and shear protectants on survival of erythrocytes in suspension. J. Biotechnol. 1995; 43(1):33-40.

Ziegler, B.L., Valtieri, M., Porada, G.A., De Maria, R., Muller, R., Masella, B., Gabbianelli, M., Casella, I., Pelosi, E., Bock, T., Zanjani, E.D., Peschle, C.. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. Science 1999; 285(5433):1553-8.

Zielke, H.R., Zielke, C.L., Ozand, P.T.. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. Fed. Proc. 1984; 43(1):121-5.

Zipori, D., Sasson, T.. Myelopoiesis in the presence of stromal cells from mouse bone marrow: II. Mechanism of glucose dependent colony formation. Exp. Hematol. 1981; 9(6):663-74

6 Abkürzungsverzeichnis

2-ME	-	2-Mercaptoethanol
AMW	-	<i>engl.</i> Average Molecular Weight (durchschnittliches Molekulgewicht)
AP	-	Alkalische Phosphatase
APAAP	-	Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase
APS	-	Ammoniumpersulfat
ATCC	-	American Type Culture Collection
BCA-Assay	-	Bicinchoninic Acid-Assay (Bicinchoninsäure-Assay)
bFGF	-	Fibroblast Growth Factor - >Basic
BFU-E	-	Burst Forming Unit Erythroid
BMMNC	-	Bone Marrow Mononuclear Cells (mononukleäre Zellen aus Knochenmarkaspirat)
Bm-N	-	Zelllinie abgeleitet von der Seidenspinnerraupe <i>Bombyx mori</i> (Lepidopterenart)
BSA	-	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CAFC	-	<i>engl.</i> Cobblestone-Area Forming Cell
CB	-	<i>engl.</i> Cord Blood, Nabelschnurblut
CBMNC	-	Cord Blood Mononuclear Cells (mononukleäre Zellen aus Nabelschnur- und Plazentarestblut)
CFU-E	-	<i>engl.</i> Colony-Forming Unit Erythroid
CFU-GM	-	<i>engl.</i> Colony-Forming Unit Granulocyte/Monocyte
CFU-GEMM	-	<i>engl.</i> Colony-Forming Unit Granulocyte/Monocyte/Erythroid/Megacaryocyte
CFU-Meg	-	<i>engl.</i> Colony-Forming Unit Megacaryocyte
CFU-S	-	<i>engl.</i> Colony-Forming Unit Spleen
CHO	-	<i>engl.</i> Chinese Hamster Ovary
Col _{max}	-	unter den gegebenen Bedingungen maximale Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit
cpm	-	<i>engl.</i> Counts per minute
CXCR-4	-	Chemokinrezeptor Typ 4
DSMZ	-	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

ECACC	-	European Collection of Animal Cell Cultures
EPO	-	Erythropoetin
F _{GNE}	-	Begasungsrate
FL	-	Flt-3 Ligand
GBF	-	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, jetzt Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
G-CSF	-	<i>engl.</i> Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	-	<i>engl.</i> Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor
HES	-	Hydroxyethylstärke
HLA	-	<i>engl.</i> Histocompatibility Leucocyte Antigens
HPP-CFC	-	<i>engl.</i> High Proliferative Potential-Colony Forming Cell
HUVEC	-	<i>engl.</i> Human Umbilical Vein Endothelial Cell
iCSTR	-	<i>engl.</i> Ideal Continuous Stirred Tank Reactor (ideal durchmischter Rührreaktor)
IL-x	-	Interleukin-x
k. A.	-	Keine Angabe
k _L a	-	volumetrischer Sauerstoff-Übergangskoeffizient
KM	-	Knochenmark
KMF	-	Knochenmarkfibroblasten
KMT	-	Knochenmarktransplantation
LDA	-	Limiting Dilution Assay
LFA-1	-	Leucocyte Function-Associated Antigen-1
LIF	-	Leukemia Inhibitory Factor
LTC-IC	-	Long Term Culture-Initiating Cell
MACS	-	Magnetic Activated Cell Sorting®
MGDF	-	Megacaryocyte Growth and Development Factor
MHC	-	Major Histocompatibility Complex
mmHg	-	Druckangabe in Millimeter Quecksilbersäule
MNC	-	Mononuclear Cells (Mononukleäre Zellen)
MOI	-	Multiplicity of Infection (Viruspartikel pro Zelle)
MSC	-	<i>engl.</i> Mesenchymal Stem Cells (mesenchymale Stammzellen)
MW	-	Molecular Weight (Molekulgewicht)

n. s.	-	nicht signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit > 5%)
N _s	-	Rührerdrehzahl
OTR	-	Oxygen Transfer Rate
PBMNC	-	peripheral blood mononucleated cells (mononukleäre Zellen gewonnen aus Leukapheresat, peripheres Blut)
PBSC	-	Peripheral Blood Stem Cells (periphere Blutstammzellen)
PEEK	-	Polyetheretherketon (teilkristalliner Kunststoff)
Pharm. Eur.	-	Europäisches Arzneibuch
PI	-	<i>engl.</i> Propidium Iodide, Propidiumjodid
pO ₂	-	Gelöstsauerstoff-Partialdruck
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute
RQ	-	Respiratorischer Quotient
SCF	-	Stem Cell Factor
SCGF	-	Stem Cell Growth Factor- α
SDF-1	-	Stromal Cell Derived Factor-1
SDS-PAGE	-	<i>engl.</i> Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TBI	-	Total Body Irradiation
TBST	-	<i>engl.</i> Tris Buffered Saline Tween
TEMED	-	Tetramethylethylendiamin
TPO	-	Thrombopoetin
Tx	-	Transplantation
VLA-4	-	Very Late Antigen-4
V _R	-	Reaktorvolumen
vvm	-	Verfahrenstechnische Einheit für die Begasungsrate von Bioreaktoren (Begasungsrate pro min und Reaktorvolumen, <i>engl.</i> Volume per Volume and Minute)
v/v	-	<i>engl.</i> Volume per Volume, Volumenprozent
w/v	-	<i>engl.</i> Weight per Volume, Gewichtsprozent
X _{OGE}	-	Eingangsmolenbruch von Sauerstoff in der Begasungsatmosphäre

Dreibuchstabencode der Aminosäuren

Abkürzung		Aminosäure
Ala	-	Alanin
Arg	-	Arginin
Asn	-	Asparagin
Asp	-	Asparaginsäure
Cys	-	Cystein
Gln	-	Glutamin
Glu	-	Glutaminsäure
Gly	-	Glycin
His	-	Histidin
Ile	-	Isoleucin
Leu	-	Leucin
Lys	-	Lysin
Met	-	Methionin
Phe	-	Phenylalanin
Pro	-	Prolin
Ser	-	Serin
Thr	-	Threonin
Trp	-	Tryptophan
Tyr	-	Tyrosin
Val	-	Valin